



# Analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 : contribution de ses partenaires cdc42 et E2F1

Jean Berthelet

## ► To cite this version:

Jean Berthelet. Analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 : contribution de ses partenaires cdc42 et E2F1. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DI-JOS061 . tel-01146430

**HAL Id: tel-01146430**

**<https://theses.hal.science/tel-01146430>**

Submitted on 28 Apr 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
UFR des Sciences de la Vie



Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

**Discipline : Sciences de la Vie**

**Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Soutenue publiquement le mardi 04 novembre 2014 par

**Jean BERTHELET**

**Analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 :**

**Contribution de ses partenaires cdc42 et E2F1**

### Membres du jury

Dr. Stéphane ANSIEAU

Dr. Patrick LEGEMBRE

Dr. Laurent MAILLET

Pr. Michaël BOYER-GUITTAUT

Pr. Dominique DELMAS

Dr. Laurence DUBREZ

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse

Unité INSERM U866 « Lipides, Nutrition, Cancer » équipe Régulation Génique dans  
l'Hématopoïèse et la Leucémogénèse.

Faculté de Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon



*« J'ai toujours été dévoré par le doute. Est-ce une bonne chose ? Je pense que oui si on a une sensibilité artistique. En tout cas, la certitude est ridicule. »*

*Jean Rochefort*

*« Baiser sans barbe, omelette sans sel ! »*

*Ancien proverbe français*



## Remerciements

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

J'exprime mes remerciements au Dr. Stéphane ANSIEAU et au Dr. Patrick LEGEMBRE pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteur. Je remercie également les membres examinateurs de ce jury : le Dr. Laurent MAILLET, le Pr. Michaël BOYER-GUITTAUT ainsi que le Pr. Dominique DELMAS.

Je remercie très vivement ma directrice de thèse le Dr. Laurence DUBREZ pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de travailler à ses côtés. Merci beaucoup Laurence pour ces cinq années à travailler avec toi et toute l'équipe. J'ai énormément appris grâce à ton encadrement et ta disponibilité. Merci particulièrement pour m'avoir permis de prendre des initiatives tout en me guidant et de m'avoir fait confiance. C'est avec grand plaisir que j'ai travaillé sous ton aile pendant ces années. Un grand merci à ton mari également, Lionel qui a successivement remis en place mon dos et ma cheville...

Merci à mes parents, cricri et féfé pour les intimes... Merci de toujours avoir été là, de m'avoir toujours soutenu et de continuer à la faire. Vous avez su construire un petit cocon à Corpeau-city où il fait bon se ressourcer, la preuve, certains oisillons reviennent dans le nid ! Vous déchirez comme parents et comme grands-parents !

Un grand merci à tous les fofous de la LDD Team ! Merci tata Jessy de m'avoir supporté en tant que bébé chercheur maladroit. Merci à mon beau barbu Sir Arthur pour m'avoir fait kiffer les RhoGTPases et pour tous ces moments mémorables au labo mais aussi en dehors... Boston s'en souvient ! Merci Jennifer et Valérie pour vos précieux coups de mains et bon courage pour la suite ! Et aussi un grand merci à nos proches voisins de la LD team, petite Anne la chaudière de service, Laurent, Jean-Noël, Ronan... Mention spéciale pour mes deux RAIDeux, compatriotes de VTT, Romain et Marie qui est une pro du certif médical ! Romain bon courage pour la fin, j'ai hâte de connaître la suite des événements pour pupuce et toi, et n'oublie pas, on a un défi roc à préparer !

Merci aux collègues de Master, Pierrot, Aymeric, Valentin pour tous ces conseils et surtout les délires ! Pierrot mon éternel binôme, love you dude... Valou, ta poésie quotidienne a rythmé mes journées avec une fraîcheur et une sensibilité inégalée, sans compter nos RDV secrets de 14h16 ! Ça a été vraiment cool de se suivre et aussi de se soutenir quand c'était pas simple.

Merci à ma copine Margaux, Mgx, d'être toujours là et de supporter les choux de Bruxelles et le poisson... Ton prince viendra, même si j'ai toujours pas vraiment compris à quoi il va ressembler ! C'est quand tu veux pour un week-end entre filles...ou pas !

Merci à tout le bureau FG, Hélène, Fred, Marion, Etienne, Flavie, Alexia, Christel, Emeric...pour l'accueil chaleureux les midis et pour le café avec les petits gâteaux fait maison !

Tant que j'y suis avec le bureau FG, merci particulier à Emeric et Rominet pour vos attouchements quotidiens proches de l'harcèlement sexuel, ça met un peu de douceur dans ce monde de brutes...

Merci aux petits jeunes, Alexia, Etienne, Jennifer, Laetitia, Victor, Pierre, Flavie, Marion...pour les supers soirées pain, vin, charcuterie, vin, fromage, vin, vin... Je vous souhaite une super thèse, mais je suis pas inquiet, y'a une sacrée team !!! Mes enceintes ne vous oublieront jamais, tout comme mes voisins !

Un grand merci à super Nanou Ninette pour ton soutien, tes coups de main et tes coups de pied au ... quand j'avais l'impression que jamais j'Y (j'y sais à quel point tu y adores les « y ») arriverai! Merci de m'avoir véhiculé quand j'étais tout cassé et d'avoir fait la super infirmière quand j'étais à nouveau tout cassé...

Merci à Catherine pour les coups de main *vivo* mais pas seulement, merci pour ton sourire toujours aussi agréable, ton humour et tes petites phrases bien placées !

Merci à Cindy et Marion de m'avoir fait découvrir les joies de la recherche quand j'étais tout bébé...et Cindy encore pardon pour ton pied !

Un grand merci aux plateaux techniques, merci à Arlette de m'avoir aidé face à la profonde solitude que je ressens en tête à tête avec un cytomètre... Merci à André pour la vidéo-microscopie et les coups de main pour mettre au point les fameuses manip d'intercalation ! Promis le proto arrive !! Merci à ma bichette Benoît, pour tout ce que tu as fait au labo, les vidéos lancées la nuit, le week-end, pendant tes congés...les poumons qui remontent de l'animalerie à 18H avant de se lancer dans une super séance de microscope mêlant Science, Bricolage et fous rires ! Et bien sûr merci pour tout le reste en dehors du labo, les soirées, les repas en amoureux, le bad, les films, les bières, les vacances dans ta famille...la liste est longue ! Maintenant tu as mis la main sur ta perle rare et vous êtes choubidou !!

Un grand merci à toutes les personnes de la faculté de médecine et du 3<sup>ème</sup> étage que j'ai côtoyé pendant ma thèse, la Micheau Team et les discussions projets sur le toit avec Olivier, l'EPHE, la team Garrido et tous les autres. Une grosse Bise au seul vrai et unique Jo-Jo, des comme toi y'en a pas d'autre, je me tiendrai au courant de tes prochaines péripéties dentaires !

Un grand merci à toute ma famille aussi, les tontons, les tatas (merci Alice pour la relecture approfondie de mon manuscrit !), les cousins, les frangines, les beaufs et mes petits rayons de soleil Lou-Anne, Léonie, Evan, Charlie et Swann. Je suis tellement fier de vous, je sais que la relève est largement assurée et quelle relève !

Je ne remercie ni Vivien, ni Fabien, ni Benjamin parce qu'il faut pas déconner non plus, je fais pas dans le social...

En revanche, je remercie Bach, Ben et Fab les 3 frangins. Une paire d'années que je vous ai dans les pattes... Non sans rire, merci les dudies, toujours là, toujours prêt à tout, you rock ! Si sentimentalement on est une bonne brochette de champions...amicalement on craint personne ! Je vous aime les poulets.

Enfin un grand merci à toi Tinguette, pour tout, IFLY.

## **Analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 : Contribution de ses partenaires cdc42 et E2F1.**

La protéine cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1*) de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) est un oncogène avec une activité E3 ubiquitine ligase. Au cours de la différenciation de nombreux modèles cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales du colon, cellules souches hématopoïétiques, cardiomyocytes), cIAP1 sort du noyau pour se relocaliser dans le cytoplasme, cette relocalisation étant associée à un arrêt de prolifération. La plupart des fonctions connues de cIAP1 sont liées à sa localisation cytoplasmique où il est un régulateur important des voies de signalisation des récepteurs du TNF- $\alpha$  et de NF- $\kappa$ B. Cependant, cIAP1 est principalement exprimée dans le noyau de différents types cellulaires ce qui n'est pas en accord avec son rôle dans la signalisation cellulaire. Mon travail de thèse a permis d'identifier un rôle de cIAP1 dans la prolifération cellulaire. cIAP1 interagit avec le facteur de transcription E2F1 et favorise son recrutement sur les promoteurs des Cycline E et A impliquées dans les transitions G1/S et G2 du cycle cellulaire, ce qui augmente l'expression des transcrits et des protéines de ces deux cibles. Il semblerait que par cette activité, cIAP1 régule la prolifération des cellules et soit important dans l'équilibre entre la prolifération et la différenciation, deux mécanismes cellulaires étroitement liés. Dans un second travail, nous avons montré que cIAP1 est déterminant dans le remodelage du cytosquelette d'actine en réponse au TNF- $\alpha$ . Dans les fibroblastes, le TNF- $\alpha$  induit la formation de fines protrusions membranaires riches en actine appelées filipodes, cette formation étant régulée par cdc42. Mes travaux ont montrés que cIAP1, associé à son partenaire historique TRAF2, régule la formation de ces filipodes. Il est capable d'interagir directement avec la RhoGTPase Cdc42 et de contrôler son activation après un traitement par le TNF-  $\alpha$ , mais aussi par l'EGF. De plus, cIAP1 régule également la transformation oncogénique par HRas en augmentant les propriétés invasives et migratoires des cellules. Ces nouvelles fonctions de cIAP1 pourraient contribuer à ses propriétés oncogéniques.

**Mots clés :** cIAP1, E2F1, cdc42, prolifération, TNF- $\alpha$ , cytosquelette d'actine, Rho GTPases, filipodes, HRas, transformation oncogénique.

### **cIAP1 oncogenic properties analysis : contribution of its partners cdc42 and E2F1.**

The inhibitor of apoptosis protein cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein-1) from the IAP family (Inhibitor of Apoptosis Protein) is an oncogene with an E3 ubiquitin ligase activity. cIAP1 is relocalized from the nucleus to the cytoplasm during the differentiation of many kind of cellular models (macrophages, dendritic cells, colon epithelial cells, hematopoietic stem cells, cardiomyocytes) and this relocalization is associated with a proliferation arrest. The well-known functions of cIAP1 are associated with its cytoplasmic localization, where it regulates the TNF $\alpha$  receptors and NF- $\kappa$ B signaling pathways. However, cIAP1 is mainly expressed in the nucleus on many cell types which is not in accordance with its cell signalling activity. My work identifies a function of cIAP1 in proliferation regulation. cIAP1 interacts with E2F1 transcription factor and favors its recruitment on Cyclins E and A promoters, both involved in G1/S and G2 phases of the cell cycle, which leads to high level of transcript and protein expression of these two targets. It seems that cIAP1 regulates the cellular proliferation and is important for the balance between proliferation and differentiation, two mechanisms tightly connected in cells. In a second work, we showed that cIAP1 is critical for actin cytoskeleton modification upon TNF- $\alpha$  treatment. In fibroblasts, TNF- $\alpha$  induce filipodia formation, a process regulated by cdc42. Our work showed that cIAP1, when associated with its partner TRAF2, interact and control cdc42 activation, a member of Rho GTPases protein family. We also observed that cIAP1 regulates HRas driven oncogenic transformation and increases the motility and invasiveness of the cells. These new functions of cIAP1 in the control of transcription factor and cell cytoskeleton could be important for its oncogenic properties.

**Keywords:** cIAP1, E2F1, cdc42, proliferation, TNF- $\alpha$ , actin cytoskeleton, Rho GTPases, filipodia, HRas, oncogenic transformation.



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>I) PREAMBULE</b>	<b>16</b>
<b>II) HISTORIQUE ET CONTEXTE : LES IAP</b>	<b>17</b>
A) <i>Relation structure-fonction des IAP et leur régulation</i>	17
1. Domaines BIR	17
2. Domaine RING (Really Interesting New Gene)	21
3. Domaine CARD	22
4. Domaine UBA (UBiquitine-Associating domain)	22
5. Séquences NES (Nuclear Export Signal)	22
<b>III) FONCTIONS DE cIAP1</b>	<b>24</b>
A) <i>Régulation des caspases initiateuses et effectrices par les IAP</i>	26
1. Les caspases	26
2. Régulation de l'activation de la caspase-9 par XIAP	26
3. Régulation de l'activation des caspase-8 et -10 par les IAP	27
4. Régulation des caspases effectrices par les IAP	28
B) <i>Régulation de la signalisation cellulaire par cIAP1 et 2</i>	31
1. La voie NF- $\kappa$ B	31
2. Régulation de la kinase RIP par cIAP	32
3. Régulation des TLR par cIAP	35
4. Régulation de la voie NOD par cIAP	36
C) <i>Les fonctions nucléaires de cIAP1</i>	36
D) <i>Régulation de la migration cellulaire par les IAP</i>	38
<b>IV) PROPRIETES ONCOGENIQUES DE cIAP</b>	<b>41</b>
A) <i>Modification de l'expression de cIAP dans les tumeurs et démonstration de leur propriétés oncogéniques</i>	41
B) <i>Le cas du lymphome de MALT</i>	43
C) <i>cIAP et métastases</i>	44
D) <i>cIAP comme suppresseurs de tumeurs</i>	44
<b>V) LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1</b>	<b>46</b>
A) <i>Présentation de la famille des E2F</i>	46
B) <i>Le rôle des E2F dans la régulation du cycle cellulaire et leur régulation</i>	47
C) <i>E2F1 dans la régulation de l'apoptose</i>	49
1. Voie dépendante de p53	49
2. Voies indépendantes de p53	49
<b>VI) LE ROLE DE E2F1 DANS LE CANCER</b>	<b>51</b>
A) <i>Dérégulation de E2F1 dans les échantillons tumoraux</i>	51
B) <i>E2F1 ou comment un suppresseur de tumeur participe à la progression tumorale</i>	51
1. Le fragile équilibre entre prolifération et apoptose	51

2.	E2F1 et la formation de métastases.....	53
3.	L'importance des cofacteurs de E2F1 dans la progression tumorale.....	56
4.	E2F1 et la résistance au traitement .....	56
<b>VII)</b>	<b>CDC42, UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES RHOGTPASES.....</b>	<b>60</b>
A)	<i>Les RhoGTPases.....</i>	60
B)	<i>Le cycle d'activation des RhoGTPases.....</i>	60
1.	Les Facteurs d'échanges : GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor).....	60
2.	Les Activateurs de GTPase : GAP (GTPase-Activating Protein).....	61
3.	Les RhoGDI.....	61
<b>VIII)</b>	<b>LES PROCESSUS BIOLOGIQUES REGULES PAR CDC42 ET LEUR IMPORTANCE DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL.....</b>	<b>62</b>
A)	<i>Cdc42 et la formation de filipodes.....</i>	62
B)	<i>Cdc42 dans la polarisation cellulaire.....</i>	64
C)	<i>L'activation de cdc42 dans la transformation oncogénique.....</i>	66
D)	<i>Modification de la régulation de cdc42 dans le cancer.....</i>	66
1.	Dérégulation de GEF dans le cancer .....	66
2.	Dérégulation de GAP dans le cancer.....	67
3.	Dérégulation de RhoGDI dans le cancer .....	67
E)	<i>Cdc42 dans la formation de métastases.....</i>	67
1.	Formation d'invadopodes et activation des MMP.....	69
2.	Cdc42 dans la migration des cellules cancéreuses.....	70
<b>IX)</b>	<b>LA TRANSFORMATION ONCOGENIQUE PAR HRASV12 ET L'IMPACT DE CDC42.....</b>	<b>73</b>
A)	<i>L'oncogène Ras.....</i>	73
1.	La voie Ras/Raf/MEK/Erk .....	73
2.	La voie PI3K/AKT .....	73
B)	<i>La transformation oncogénique par HRasV12 .....</i>	74
1.	Mise en place de mécanismes de protection des cellules : la sénescence induite par Ras. ....	74
2.	Coopération entre HRas et cdc42 dans la transformation oncogénique. ....	76
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>80</b>
<b>I)</b>	<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>81</b>
<b>II)</b>	<b>ANALYSE DE L'INTERACTION DE cIAP1 AVEC LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F1.....</b>	<b>82</b>
A)	<i>cIAP1 régule le facteur de transcription E2F1 et la prolifération cellulaire. Article 1.....</i>	82
B)	<i>cIAP1 contrôle l'activité de E2F1 sur les promoteurs d'effecteurs de l'apoptose.....</i>	105
1.	cIAP1 stimule l'activité de E2F1 sur le promoteur de la caspase-7.....	105
2.	cIAP1 est recruté sur les promoteurs des caspases-7 et -9 et il est nécessaire au recrutement de E2F1.....	105
3.	Variation du recrutement de cIAP1 et E2F1 sur les promoteurs de la cycline E et de la caspase-7 en réponse au traitement à l'étoposide. ....	107
C)	<i>Analyse des mécanismes de régulation de E2F1 par cIAP1. ....</i>	109
D)	<i>Recherche des sites d'interaction cIAP1 - E2F1. ....</i>	111
E)	<i>Conclusion .....</i>	111

III) ANALYSE DE L'INTERACTION DE cIAP1 AVEC LES GTPASES DE LA FAMILLE RHO. ....	112
A) Rôle de cIAP1 sur le remodelage du réseau d'actine et la régulation de cdc42. ....	112
IV) UN NOUVEAU MODELE CELLULAIRE PERMETTANT L'ETUDE DES FONCTIONS DE cIAP1	
IMPORTANTES POUR SON ONCOGENICITE. ....	138
A) Comparaison des cellules MEF HRasV12 WT, cIAP1 <sup>-/-</sup> et DKO. ....	138
B) Restauration de l'expression de cIAP1 WT ou de ses mutants dans les MEFs cIAP1 <sup>-/-</sup> ou DKO. ....	138
C) Evaluation des propriétés oncogéniques des cellules restaurées par cIAP1 WT ou ses mutants. ....	142
D) Conclusion ....	142
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>144</b>
I) cIAP1 DANS LA SIGNALISATION DU TNF- $\alpha$ . ....	145
II) LES IAP DANS LA REGULATION DES RHO GTPASES ET LEUR INFLUENCE SUR LA MIGRATION CELLULAIRE. ....	145
1. Compétition pour RhoGDI. ....	146
2. L'ubiquitination des RhoGTPases par les IAP. ....	148
III) REGULATION DE E2F1 PAR cIAP1. ....	149
A) Interaction cIAP1 /E2F1. ....	149
B) La fonction E3 ubiquitine ligase de cIAP1. ....	149
IV) LE ROLE DE cIAP1 DANS LE CANCER. ....	151
A) La régulation de la signalisation cellulaire. ....	151
B) Impact de la régulation de cdc42. ....	151
C) Impact de la régulation de E2F1. ....	152
D) Impact de cIAP1 sur la sénescence induite par Ras. ....	152
V) cIAP1 COMME CIBLE THERAPEUTIQUE. ....	155
A) Le développement des Smac mimetics. ....	155
B) Mode d'action des Smac mimetics. ....	155
C) Effets délétères des Smac mimetics. ....	156
VI) CONCLUSION – PERSPECTIVES. ....	157
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>158</b>



## Liste des Tableaux

<u>Tableau 1:</u> Niveau d'expression des différents IAP et leurs antagonistes dans les tumeurs humaines .....	40
--	----

## Liste des Figures

<u>Figure 1</u> : Les domaines caractéristiques des IAP .....	18
<u>Figure 2</u> : Enzymes et réactions du système ubiquitine protéasome .....	20
<u>Figure 3</u> : Régulation de l'apoptosome et des caspases par les IAP .....	25
<u>Figure 4</u> : Régulation des voies classique et alternative de NF- $\kappa$ B par cIAP .....	30
<u>Figure 5</u> : Régulation des plateformes activatrices des caspases contenant RIP par cIAP .....	33
<u>Figure 6</u> : Propriétés oncogéniques de cIAP dans un modèle de carcinome mammary murin .....	42
<u>Figure 7</u> : Structure des membres de la famille E2F et de leurs co-activateurs .....	45
<u>Figure 8</u> : Régulation de l'activité des facteurs de transcription E2F .....	48
<u>Figure 9</u> : Régulation de l'expression des cibles de l'apoptose ou de la prolifération de E2F1 par la voie PI3K/AKT .....	52
<u>Figure 10</u> : Comment E2F1 favorise la progression tumorale.....	55
<u>Figure 11</u> : Les effecteurs et fonctions cellulaires régulés par les RhoGTPases et leur cycle d'activation .....	59
<u>Figure 12</u> : Cdc42 dans la formation de filipodes .....	63
<u>Figure 13</u> : Les mutants de cdc42 .....	65
<u>Figure 14</u> : cdc42 et la formation de métastases .....	68
<u>Figure 15</u> : Les voies de signalisation activées par Ras .....	72
<u>Figure 16</u> : Boucle d'amplification de la voie PI3K.....	77
<u>Figure 17</u> : cIAP1 stimule l'activité transcriptionnelle de E2F1 sur le promoteur de la Caspase-7 .....	104
<u>Figure 18</u> : Le recrutement de cIAP1 est nécessaire au recrutement de E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E, de la Caspase-7 et de la Caspase-9 .....	104
<u>Figure 19</u> : Mise en place d'un modèle d'induction de l'apoptose.....	106
<u>Figure 20</u> : Recrutement de cIAP1 et E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E et de la Caspase-7 après 3 heures de traitement à l'étoposide .....	108
<u>Figure 21</u> : E2F1 est une cible d'ubiquitination de cIAP1 .....	108
<u>Figure 22</u> : E2F1 interagit avec le domaine BIR3 de cIAP1 .....	110

<u>Figure 23</u> : cIAP1 régule l'activation de cdc42 et la formation de filipodes en réponse au TNF- $\alpha$ .....	136
<u>Figure 24</u> : Comparaison des MEF HRasV12 WT, cIAP1 <sup>-/-</sup> et DKO.....	137
<u>Figure 25</u> : Caractérisation in vitro des MEF HRasV12 restaurées par cIAP1 WT, L47A, H588A ou $\Delta\alpha1B3$ .....	139
<u>Figure 26</u> : Evaluation des propriétés oncogéniques des cellules restaurées par cIAP1 WT ou ses mutants.....	141
<u>Figure 27</u> : Compétition des RhoGTPases pour la fixation à RhoGDI ou leur dégradation et l'influence de cIAP1.....	148
<u>Figure 28</u> : Hypothèse sur les complexes formés par cIAP1 H588A et leur activité E3 ubiquitine ligase.....	150
<u>Figure 29</u> : Influence de cIAP1 sur la transformation oncogénique par HRasV12 .....	154

## Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	adénosine-5'-triphosphate
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BIRC	BIR containing protein
CARD	Caspase Activating Recruitment Domain
Caspase	CysteinyI Apartate Specific ProteASE
CD	Cluster of Differentiation
Cdk	Cyclin dependant kinase
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
Chk1	Checkpoint Kinase 1
clAP1 /2	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1/2
DARK	Drosophila Apaf-1-Related Killer
DBD	DNA Binding Domain
DIAP1	Drosophila IAP 1
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
DRONC	Drosophila Nedd-2 like Caspase
E2F	E2 transcription Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
ERK	Extracellular signal related kinase
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
GAP	GTPase-Activating Protein
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
HDAC	Histone Déacetyl Transférase
HMTase	Histone Methyltransférase
HSP	Heat Shock Protein
HTRA2	High Temperature Required Protein A2
IAP	Inhibitors of Apoptosis poteins
IBM	IAP Biding Motif
IKK	IkB $\alpha$ Kinase Kinase
IKK $\gamma$	IkB $\alpha$ Kinase Kinase $\gamma$ (NEMO)
INK4	Inhibitor of Cdk4
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IkB	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IkB- $\alpha$	Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha
LUBAC	Linear Ubiquitin chain Assembly Complex
Mad-1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDM2	Mouse Double Minute2
MEC	Matrix extra cellulaire
MEF	Mouse Embryonnic Fibroblast

MEKK	MAPK /ERK Kinase Kinase
MMP	Métalloprotéinases matricielles
NES	Nuclear Export Signal
NF-κB	Nuclear Factor κB
NIK	NF-kappa-B-inducing kinase
NLR	NOD-like receptors
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing proteins
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIDD	p53-induced protein with death domain
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAIDD	Receptor-interacting protein-Associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a Death Domain
Rb	Retinoblastoma protein
RhoGDI	Rho GDP-dissociation Inhibitor
RING	Really Interesting New Gene
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
TAB1	TAK1 Binding protein 1
TAK1	TGFβ-activated protein kinase 1
TLR	Toll Like Receptors
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAF2	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UBA	Ubiquitine-Associating domain
VASP	Vasodilatator-Stimulated Phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP	X-linked IAP

# Introduction

## I) Préambule

D'après l'organisation mondiale de la santé, le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 8,2 millions de décès en 2012. Les plus meurtriers sont les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du côlon et du sein. Il existe 5 principaux facteurs qui sont responsables de 30% des décès par cancer : un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool. On estime que le nombre de cas de cancer par an devrait augmenter de 14 millions en 2012 à 22 millions au cours des deux prochaines décennies. La lutte contre le cancer est ainsi devenue au cours des dernières décennies une priorité de santé publique.

L'appellation cancer regroupe un grand nombre de maladies pouvant toucher tous les organes du corps. Leur point commun est la présence dans l'organisme de cellules anormales capables de proliférer de manière non contrôlée et d'échapper à la mort cellulaire.

Les chercheurs Hanahan et Weinberg ont établi un modèle permettant de résumer les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2011) qui sont importantes pour la grande majorité des cancers :

- Maintien des signaux prolifératifs
- Prolifération infinie, indépendante du vieillissement cellulaire
- Résistance aux signaux anti-prolifératifs
- Résistance à la mort cellulaire
- Capacité d'induire l'angiogenèse
- Capacités invasives et formation de métastases
- Dérèglement métabolique
- Echappement au système immunitaire

En plus de ces caractéristiques des cellules cancéreuses, les chercheurs ont également établi deux propriétés importantes pour l'acquisition de ces caractéristiques lors de l'initiation du cancer : l'instabilité génomique entraînant l'accumulation de mutations et l'activation de l'inflammation.

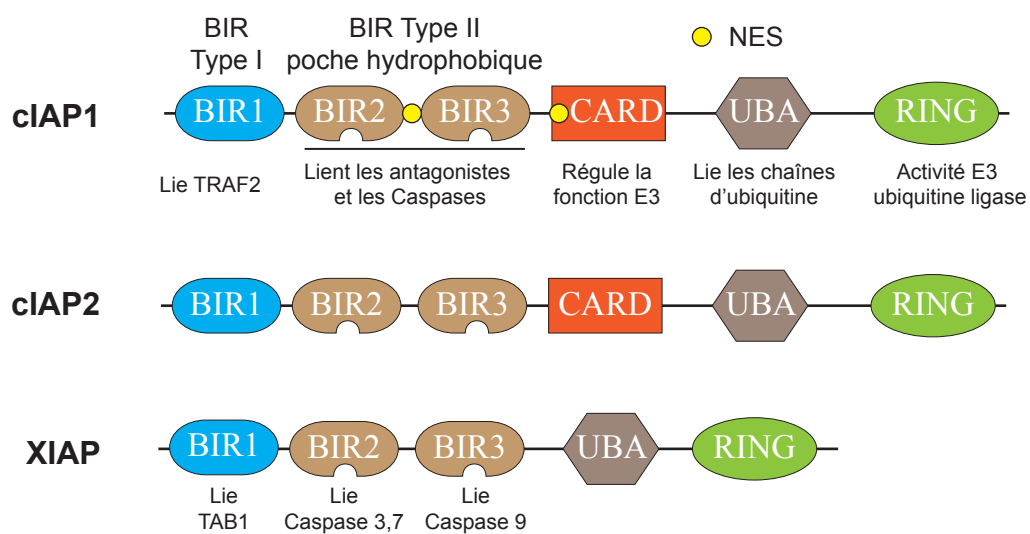
La protéine cIAP1 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) est une protéine fortement exprimée dans de nombreux échantillons de cancers. Il a été montré que cIAP1 pouvait agir à différents niveaux : dans la survie des cellules tumorales et dans leur résistance aux traitements. L'influence des protéines de la famille des IAP dans la progression tumorale les a rapidement désignées comme des cibles thérapeutiques de choix. Des inhibiteurs pharmacologiques des IAP ont ainsi été conçus et se sont avérés être efficaces pour détruire les cellules tumorales en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques.

Les travaux menés par mon équipe d'accueil ont révélé de nouvelles fonctions de cIAP1 pouvant expliquer, au moins en partie, les propriétés oncogéniques de cIAP1. L'objectif de ma

thèse a consisté en l'évaluation de l'importance de ces nouvelles fonctions de cIAP1 sur ses propriétés oncogéniques.

Avant de détailler les principaux résultats obtenus au cours de ces quatre années de thèse, une brève revue bibliographique nécessaire à la compréhension du sujet est développée dans l'introduction.





**Figure 1 : Les domaines caractéristiques des IAP.** Chaque membre de la famille des IAP possède un ou plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine BIR (Baculovirus IAP Repeat). Les domaines BIR de type I lient les adaptateurs moléculaires de la famille des TRAF (TNF Receptor Associated Factors) tandis que les domaines BIR de type II reconnaissent des motifs IBM (IAP Binding Motif) présents sur Smac ou les caspases. Le domaine UBA (UBiquitine-Associating domain) est un site de reconnaissance de chaînes d'ubiquitines. Les domaines RING possèdent une activité Ubiquitine ligase, ils reconnaissent et lient les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et catalysent le transfert d'ubiquitine vers un substrat. Ces domaines RING sont aussi des plateformes de dimérisation. Enfin, le domaine CARD est un domaine auto-inhibiteur qui régule le fonctionnement du domaine RING. cIAP1 possède des séquences d'export nucléaire (NES) responsables de sa relocalisation nucléo-cytoplasmique.

## II) Historique et contexte : les IAP

Les IAP (Inhibitors of Apoptosis proteins) ont été découverts chez le baculovirus en 1993 par l'équipe de L.K Miller (Crook, Clem et al. 1993) dans une étude étudiant les protéines virales capables d'inhiber l'apoptose des cellules infectées par le virus. Les IAP ont ensuite été identifiés chez la drosophile, le nématode *C.elegans*, les plantes et les mammifères (Kim, Lee et al. 2011). Chez les mammifères, on compte huit membres de la famille des IAP : cIAP1, cIAP2 (cellular IAP1 & 2), XIAP (X-linked IAP), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), Apollon, ML-IAP (MeLanoma IAP), ILP2 (IAP-like protein 2) et la survivine (Dubrez-Daloz, Dupoux et al. 2008). Ces protéines ont tout d'abord été considérées comme des inhibiteurs de l'apoptose, notamment par l'inhibition directe des caspases (CysteinyI Apartate Specific ProteASES), mais de nombreuses études ont ensuite démontré leur importance dans différents processus cellulaires et notamment dans la signalisation des récepteurs de mort de la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Gyrd-Hansen and Meier 2010).

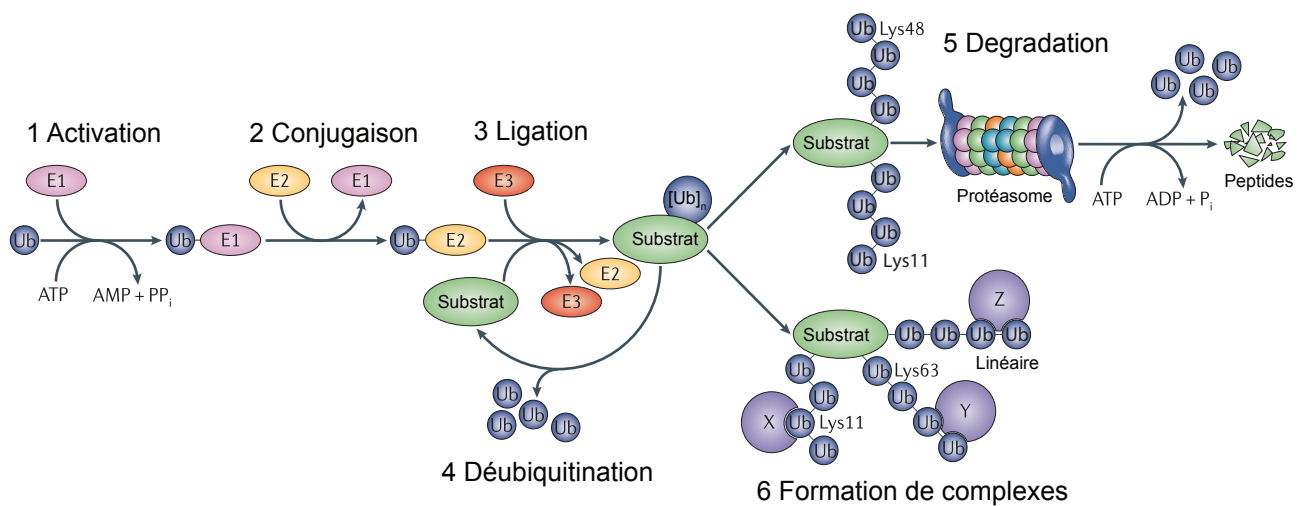
### A) Relation structure-fonction des IAP et leur régulation

#### 1. Domaines BIR

Les IAP sont définis par la présence dans leur structure d'au moins un domaine BIR (Baculovirus IAP Repeat) en position N-terminale (*Figure 1 : Les domaines caractéristiques des IAP*). Il s'agit de domaines d'interaction protéine-protéine d'environ 70 aminés en doigt de zinc avec une séquence consensus CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>HX<sub>6</sub>C. Il existe deux catégories de domaines BIR différenciés par la présence (Type II) ou l'absence (Type I) d'une poche hydrophobique importante pour la liaison peptidique de motif IBM (IAP Binding Motif) (Berthelet and Dubrez 2013).

Les domaines BIR de Type II s'associent aux protéines possédant à leurs extrémités amino-terminale un motif IBM (Wu, Cocina et al. 2001). Ce motif de séquence consensus A(K, T, V, I)(P, A, E)(F, E, I, S, Y) est retrouvé chez plusieurs partenaires des IAP tels que les caspases-3, -7 -9, et les antagonistes des IAP SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of caspases), HTRA2 (High Temperature required protein A2) et leurs homologues présents chez la drosophile Hid, Grim et Reaper (Vaux and Silke 2003). Les IAP peuvent lier ce motif que lorsqu'il est exposé en position N-terminale. Dans le cas des caspases, l'IBM se situe en position N-terminale des sous-unités actives. Les IAP peuvent donc lier uniquement les caspases sous leurs formes actives après clivage protéolytique activateur.

Les domaines BIR de Type I ne possèdent pas de poche hydrophobique permettant l'interaction avec les motifs IBM. Ils demeurent cependant très importants pour l'interaction avec des intermédiaires de signalisation. Par exemple, l'interaction de cIAP1-2 avec TRAF1-2 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 1 et 2) (Rothe, Pan et al. 1995, Samuel, Welsh et al. 2006).



**Figure 2: Enzymes et réactions du système ubiquitine protéasome.** L'ubiquitination et la dégradation des protéines fait intervenir une série de réactions par les enzymes du Système Ubiquitine-Protéasome (UPS). **(1)** La réaction d'activation résulte du transfert d'une molécule d'ubiquitine sur l'enzyme E1 de manière ATP-dépendante. **(2)** L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison E2. **(3)** L'enzyme E3 ligase, lie alors la E2 et catalyse la fixation du résidu ubiquitine sur une lysine du substrat. **(4)** Les enzymes de déubiquitination permettent le détachement des molécules d'ubiquitine présentes sur le substrat. **(5)** Les chaînes d'ubiquitines reliées les unes aux autres par les lysines 48 ou 11 sont un signal de reconnaissance par le complexe du protéasome qui va conduire à leur dégradation. **(6)** Les chaînes reliées par les lysines 63, 11 ainsi par leurs extrémités terminales (chaînes d'ubiquitine linéaires) sont reconnues par d'autres protéines (UBA, UBD) et servent à l'assemblage de complexes protéiques (D'après Vucic et al., 2011).

## 2. Domaine RING (Really Interesting New Gene)

Une activité fondamentale des IAP est leur capacité à conjuguer des molécules d'ubiquitine aux protéines partenaires. Cette fonction est conférée aux IAP par un domaine RING.

### 2.i Conjugaison de molécules d'ubiquitine : fonction E3 ubiquitine ligase

Le domaine RING, présent à l'extrémité carboxy-terminale de XIAP, cIAP1, cIAP2, ML-IAP et ILP-2 contient un motif à cystéines et histidines CX<sub>2</sub>CXNCXHX<sub>2</sub>-3CX<sub>2</sub>CXMCX<sub>2</sub>C. Ce domaine confère aux IAP une activité E3 ubiquitine ligase. Le domaine RING permet à la E3 de lier la E2 et catalyse le transfert d'une molécule d'ubiquitine de la E2 vers un résidu lysine (K) du substrat (*Figure 2 : Enzymes et réactions du système ubiquitine protéasome*). Il existe trente différentes E2, les domaines RING des IAP lient les E2 de la famille des Ubch5 (a, b, c) et des Ubch13 (Dynek, Goncharov et al. 2010). Les IAP stimulent une polyubiquitination « dégradative » de type K48 (liaison de chaînes d'ubiquitines associées aux niveaux des résidus K48) sur les caspases-3, -7, -9, TRAF1-3, SMAC, NIK (NF-kappa-B-inducing kinase), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)... Les IAP peuvent aussi transférer des chaînes d'ubiquitine « non-dégradative » de type K63 et K11 sur RIP1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) qui jouent un rôle central dans l'activation de la voie NF-κB (Nuclear Factor κB) (Bertrand, Milutinovic et al. 2008, Dynek, Goncharov et al. 2010). cIAP1 est aussi capable de mono-ubiquitiner certains substrats comme NEMO/IKKγ (IκBα Kinase Kinase γ) (Hinz, Stilmann et al. 2010). Une étude réalisée chez la drosophile a montré que les IAP, grâce à ce domaine RING peuvent également transférer le polypeptide NEDD8 sur leurs substrats (Broemer, Tenev et al. 2010). Cette propriété a également été confirmée chez les mammifères.

Le domaine RING est aussi responsable de la dimérisation des IAP. Cette dimérisation augmente l'activité E3 ubiquitine ligase des IAP en favorisant leur liaison aux enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) (Cheung, Plenchette et al. 2008, Mace, Linke et al. 2008, Feltham, Bettjeman et al. 2011).

### 2.ii Régulation du domaine RING

Deux études ont montré que cIAP1 pouvait adopter deux conformations bien distinctes (Dueber, Schoeffler et al. 2011, Lopez, John et al. 2011). Une conformation dite fermée, dans laquelle le domaine RING est bloqué par des interactions intra-moléculaires et une conformation dite ouverte dans laquelle le domaine RING est exposé.

L'exposition du domaine RING entraîne une homodimérisation spontanée de cIAP1 en faveur de sa fonction E3 ubiquitine ligase. Les travaux de l'équipe de Meier ont suggéré que le domaine CARD (Caspase Activating Recruitment Domain) inhibait le domaine RING via une interaction intra-moléculaire électrostatique (Lopez, John et al. 2011). Dans une étude menée par l'équipe de Fairbrother, l'analyse de la structure cristallographique de cIAP1 a montré que

plusieurs sites, de différents domaines de cIAP1, bloquaient l'accessibilité du RING (Dueber, Schoeffler et al. 2011). La mutation ponctuelle de chacun des sites a pu révéler que les acides aminés situés dans le BIR3 étaient nécessaires au maintien de la conformation de cIAP1, contrairement à ceux situés dans le domaine CARD (Caspase Activating Recruitment Domain). Une liaison de cIAP1 par des « Smac mimetics » liant le BIR3 de cIAP1 est suffisante pour induire son changement de conformation vers la forme active (Dueber, Schoeffler et al. 2011).

### 3. Domaine CARD

Le domaine CARD est présent dans la structure de cIAP1 et cIAP2 entre le BIR3 et le RING. C'est un domaine d'homodimérisation homotypique normalement retrouvé à l'extrémité des protéines (les protéines CARD) impliquées dans les complexes de signalisation de l'apoptose ou de l'inflammation. La fonction de ce domaine est longtemps restée inconnue et les tentatives de recherche de protéines CARD interagissant avec cIAP1 se sont soldées par des échecs. La création de mutants de cIAP1 délétés de ce domaine CARD a révélé une fonction dans l'auto-inhibition de l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1 (Lopez, John et al. 2011).

### 4. Domaine UBA (UBiquitine-Associating domain)

Un domaine UBA est retrouvé dans la structure des IAP possédant un domaine RING. C'est un domaine de liaison de l'ubiquitine, constitué de 3 hélices  $\alpha$  compactées. Une première étude a montré que le domaine UBA de cIAP1 lie indifféremment les molécules d'ubiquitine seules (mono) ou organisées en chaînes (poly) (Blankenship, Varfolomeev et al. 2009). Cette absence de spécificité a été remise en cause par un deuxième travail montrant que les domaines UBA des IAP lient uniquement les chaînes d'ubiquitine de type K63 (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008). Une interaction de cIAP1 avec les chaînes de polyubiquitines K63 de TRAF6 est nécessaire dans l'assemblage d'un complexe ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)-TRAF6-cIAP1 permettant l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à un stress génotoxique (Hinz, Stilmann et al. 2010). Ce domaine UBA est par ailleurs essentiel à cIAP1 pour protéger les cellules de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ). Les domaines UBA de XIAP et de cIAP2-MALT1 (Mucosal-Associated Lymphoid Tumors) permettent la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine de IKK $\gamma$  ce qui stimule l'activation de NF- $\kappa$ B (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008).

### 5. Séquences NES (Nuclear Export Signal)

Une recherche in silico a permis d'identifier dans la structure de cIAP1 trois régions hydrophobes riches en leucines qui sont des séquences consensus d'export nucléaire (NES). La reconnaissance des séquences NES par la protéine CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) permet leur association au NPC (Nuclear Pore Complex) qui va conduire à la translocation des protéines dans le cytoplasme. Des expériences de mutagénèse dirigée ont permis d'identifier le NES localisé dans le domaine CARD comme étant nécessaire à la relocalisation nucléocytoplasmique de cIAP1 observée lors de la différenciation, processus inhibé par un traitement à la

leptomycine B, un inhibiteur de CRM1 (Plenchette, Cathelin et al. 2004). D'autres travaux ont identifié un NES localisé entre les domaines BIR2 et BIR3 permettant l'export nucléaire de cIAP1 au cours de l'apoptose (Vischioni, Giaccone et al. 2004).

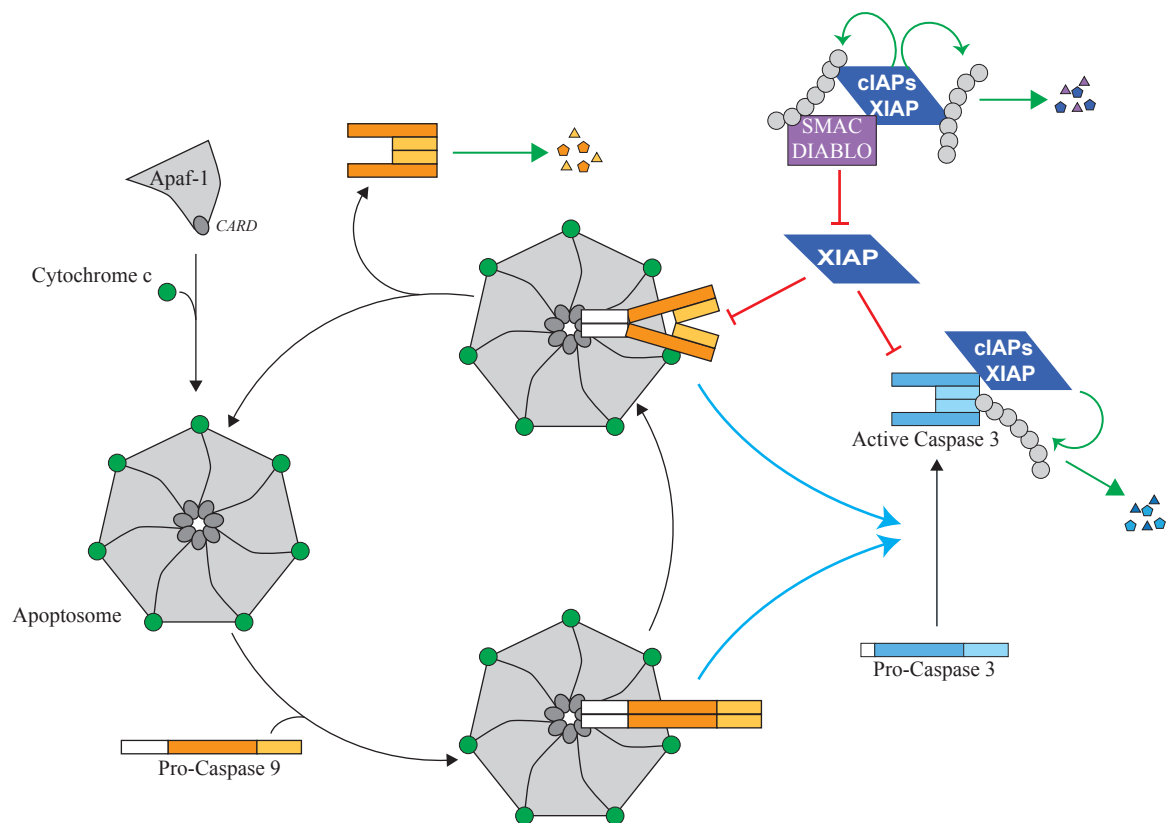
### III) Fonctions de cIAP1

L'analyse d'organismes invalidés pour les IAP chez la drosophile a permis de mettre en évidence d'importants troubles du développement dus à une perte de contrôle de l'activation des caspases. Une inhibition des IAP conduit à une apoptose massive des cellules. DIAP1 (Drosophila IAP1, l'homologue de cIAP1 chez la drosophile) lie et inhibe l'activation et l'activité de la caspase initiateur DARK (Drosophila Apaf-1-Related Killer). La neutralisation de DIAP1 est nécessaire et suffisante à l'induction de l'apoptose. Une neutralisation de DIAP1 est aussi requise pour l'activation des caspases nécessaire au développement des antennes, des yeux et du système trachéal de la drosophile (Tenev, Zachariou et al. 2002, Cullen and McCall 2004). Dans des conditions physiologiques, les IAP sont neutralisés par les antagonistes Reaper, Grim et Hid (RGH). Ces protéines, comme les caspases, possèdent un motif IBM (voir paragraphe II.A.1). Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs empêchant l'interaction IAP-caspases et inhibant l'activité anti-caspases des IAP (Vucic, Kaiser et al. 1997). Leurs homologues humains sont SMAC/DIABLO et HTRA2/Omi.

Les IAP de mammifères sont aussi capables de lier et d'inhiber les caspases, cette fonction étant bloquée par SMAC/DIABLO. Cependant, d'autres fonctions ont été décrites, qui s'avèrent être plus importantes. Les souris déficientes en XIAP, cIAP1 et cIAP2, ne présentent aucune anomalie de développement, ce qui suggère qu'individuellement, ils ne sont pas nécessaires au développement embryonnaire (Rumble, Bertrand et al. 2008). En revanche, l'extinction simultanée de cIAP1 avec cIAP2 ou XIAP conduit à une létalité embryonnaire due à des anomalies cardiovasculaires (Moulin, Anderton et al. 2012). Cette létalité est levée par l'extinction de la kinase RIP1, montrant l'importance des IAP dans la régulation de l'activité de cette kinase.

L'étude cristallographique des complexes formés par l'antagoniste SMAC, les caspases et XIAP a conduit au développement de petites molécules mimant cette interaction appelées les « Smacs mimetics ». De façon inattendue, ces molécules s'avèrent être de puissants activateurs du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, révélant une nouvelle fonction des IAP dans la régulation de l'activation de ce facteur de transcription (Gyrd-Hansen and Meier 2010). Cette fonction a aussi été retrouvée chez la drosophile. En effet, la fonction ubiquitine ligase de DIAP2 (Drosophila IAP2) est nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B par la voie de signalisation Imd (Immune deficiency), présentant une ressemblance évidente à celle du TNFR1 chez les mammifères.

Les différents IAP sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la réponse immunitaire innée, la réponse inflammatoire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Nous nous focaliserons principalement ici sur notre protéine d'intérêt cIAP1 ainsi que cIAP2 et XIAP qui présentent d'importantes homologies de structures et de fonctions.



**Figure 3: Régulation de l'apoptosome et des Caspases par les IAP.** La libération du cytochrome-c de la mitochondrie permet le changement de conformation dépendant de l'ATP et l'oligomérisation de Apaf-1 dans un complexe heptamérique, l'apoptosome. Apaf-1 recrute ensuite la caspase-9 par son pro-domaine via une interaction CARD/CARD. La caspase-9 est activée par homo-dimérisation et permet le clivage protéolytique activateur de la caspase-9 conduisant à l'apoptose. La caspase-9 subit ensuite un auto-clivage et est rapidement déconnectée de l'apoptosome qui peut alors accueillir une nouvelle pro-caspase-9. XIAP contrôle l'activation des caspases à différentes étapes, dans l'apoptosome, XIAP lie la caspase-9 et l'inhibe ce qui stabilise le complexe Apoptosome/Caspase-9 et bloque le cycle d'activation de la caspase-9. XIAP lie également la caspase-3 active et inhibe son activité en masquant le site de liaison au substrat ou le site catalytique de la caspase et/ou en l'ubiquitinant ou la neddylant. Bien qu'incapable d'inhiber leur activité, cIAP1 lie les caspases et les ubiquitine. La fixation via l'IBM des antagonistes des IAPs comme Smac/Diablo bloque l'inhibition des caspases par XIAP. (D'après Berthelet, and Dubrez., 2013)



## **A) Régulation des caspases initiatrices et effectrices par les IAP.**

### **1. Les caspases**

Les caspases sont des protéases à cystéines capables de cliver leur substrat après un résidu aspartate. On distingue les caspases effectrices de l'apoptose telles que les caspases-2, -3, -7, -8, -9 et -10 et les caspases responsables de la maturation des cytokines comme la caspase-1. Un screening génétique visant à identifier des protéines virales capables de bloquer l'apoptose des cellules infectées a permis d'identifier les IAP comme des inhibiteurs des caspases apoptotiques (Crook, Clem et al. 1993).

L'apoptose est un mécanisme très conservé de mort cellulaire programmée. Elle est activée en réponse à de nombreux stimuli, d'origine intra- ou extra-cellulaire. Elle est nécessaire à l'organogénèse. Dans un organisme adulte, elle participe à l'homéostasie tissulaire et permet l'élimination des cellules endommagées. Elle participe ainsi aux mécanismes de protection anti-tumorale. Elle est essentielle à la réponse immunitaire, permettant l'élimination des cellules infectées et l'élimination des lymphocytes activés en fin de réponse immunitaire. Des fonctions non apoptotiques de ces caspases ont été décrites plus récemment. En effet, les caspases-3, -9 et -8 ont été impliquées dans des processus de prolifération, différenciation et migration cellulaire (Connolly, Jager et al. 2014). Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs. Elles sont activées au cours d'une série de réactions protéolytiques en chaîne. Les caspases apoptotiques peuvent être divisées en deux groupes en fonction de leur structure, de leurs mécanismes d'activation et de leur niveau d'action dans la cascade protéolytique :

- Les caspases initiatrices sont les premières impliquées. Elles sont activées par dimérisation dans des plateformes multiprotéiques. Chez les mammifères, il existe quatre caspases initiatrices : les caspase-2, -8, -9 et -10.
- Les caspases effectrices activées par clivage protéolytique par les caspases initiatrices activées. Une fois clivées, elles forment des tétramères actifs qui vont cliver leurs protéines cibles entraînant le démantèlement de la cellule.

Les IAP peuvent contrôler à la fois les caspases initiatrices comme les caspases effectrices.

### **2. Régulation de l'activation de la caspase-9 par XIAP.**

La caspase-9 est impliquée dans l'apoptose dépendante de la mitochondrie, appelée la voie intrinsèque (Mace and Riedl 2010, Wurstle, Laussmann et al. 2012). Elle est activée par différents stimuli intra- ou extracellulaires qui entraînent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie entraînant le relargage cytoplasmique de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome-c ou les antagonistes des IAP Smac/Diablo et Omi/HtrA2 (Silke, Verhagen et al. 2000, Hegde, Srinivasula et al. 2002). Dans le cytoplasme, le cytochrome-c permet l'oligomérisation de Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) qui va recruter la caspase-9 et permettre son activation au sein de l'apoptosome (Wurstle, Laussmann et al. 2012).

L'élément central de l'apoptosome, est la protéine adaptatrice Apaf-1. La liaison du cytochrome-c permet un changement de conformation et une oligomérisation de Apaf-1 dans un complexe heptamérique où le domaine CARD de Apaf-1 forme un anneau central qui recrute la pro-caspase-9 via le domaine CARD de son pro-domaine (Figure 3: Régulation de l'apoptosome et des caspases par les IAP) (Wurstle, Laussmann et al. 2012). Dans ces conditions stériques, la pro-caspase-9 va s'oligomériser et s'auto-activer. Une fois active, la Caspase-9 clive les caspases effectrices (Malladi, Challa-Malladi et al. 2009). La Caspase-9 va alors quitter l'apoptosome, elle pourra éventuellement être remplacée par une nouvelle pro-caspase-9 (Malladi, Challa-Malladi et al. 2009). La présence d'inhibiteurs de caspases réduit la vitesse de dissociation de la caspase-9 de l'apoptosome bloquant le cycle d'activation des caspases (Saikumar, Mikhailova et al. 2007). XIAP est présent au sein de l'apoptosome (Bratton, Walker et al. 2001, Srinivasula, Hegde et al. 2001), il inhibe l'activité de la forme tétramérique de la caspase-9 et l'activation des caspases effectrices.

XIAP lie directement et inhibe l'activité de la caspase-9 par un mécanisme impliquant deux sites d'interaction (Eckelman, Salvesen et al. 2006). En premier lieu, la poche hydrophobique du BIR3 de XIAP lie le motif IBM accessible à l'extrémité N-terminale de la petite sous-unité de la caspase-9 active (Srinivasula, Hegde et al. 2001). Ensuite, l'extrémité C-terminale du BIR3 lie le domaine de dimérisation de la caspase-9, bloquant sa dimérisation et masquant ses résidus catalytiques (Srinivasula, Hegde et al. 2001, Shiozaki, Chai et al. 2003). Ainsi, XIAP peut contrôler l'apoptosome en inhibant l'activité de la caspase-9 et en bloquant son cycle d'activation. De manière intéressante, une boucle de rétrocontrôle de l'apoptosome se met en place via la caspase-3 qui amplifie le processus apoptotique. La caspase-9 possède deux sites de clivage par la caspase-3. Le premier permet de produire les deux sous-unités actives, et le second enlève le motif IBM de la petite sous-unité, libérant ainsi la caspase-9 du contrôle de XIAP (Zou, Yang et al. 2003).

La formation de l'apoptosome dépend aussi de la quantité d'Apaf-1, de cytochrome-c et de pro-caspase-9 disponible (Wurstle, Laussmann et al. 2012). Il est intéressant de noter que la capacité de XIAP à contrôler l'activité de la caspase-9 est directement corrélée au niveau d'Apaf-1 et à l'activité de l'apoptosome. Ainsi, XIAP régule la sensibilité à l'apoptose des cellules exprimant un faible niveau de Apaf-1 comme les cellules neuronales différenciées et les cardiomyocytes (Wright, Linhoff et al. 2004, Potts, Vaughn et al. 2005).

### 3. Régulation de l'activation des caspase-8 et -10 par les IAP.

Les caspases-8 et -10 sont activées en réponse à la stimulation des récepteurs de mort de la superfamille des TNFR. La stimulation de Fas (DR2, CD95) ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) récepteurs I et II (DR4 and DR5) entraîne l'activation des pro-caspase-8 et -10 dans une plateforme associée au récepteur appelée DISC (death-inducing signalling complex) (Mace and Riedl 2010). Les caspases-8 et -10 peuvent aussi être activées en réponse à une

stimulation du TNFR1 dans une plateforme cytosolique secondaire appelée complexe-II ou indépendamment des récepteurs de mort dans une plateforme appelée RIPoptosome. Le complexe II et le RIPoptosome contiennent la kinase RIP1. Les IAP contrôlent la formation de ces complexes grâce à leur capacité à lier et à contrôler RIP1. Cette régulation sera expliquée dans le paragraphe III.B.2.

#### 4. Régulation des caspases effectrices par les IAP.

XIAP est également capable de lier et d'inhiber les caspases effectrices -3 et -7 (Deveraux, Takahashi et al. 1997, Silke, Ekert et al. 2001). Cependant, ces propriétés ne semblent pas fondamentales pour ses propriétés anti-apoptotique puisque l'expression d'un mutant de XIAP incapable d'inhiber la caspase-3 conserve sa capacité à bloquer l'apoptose induite par des rayonnements ultra-violets (Silke, Ekert et al. 2001).

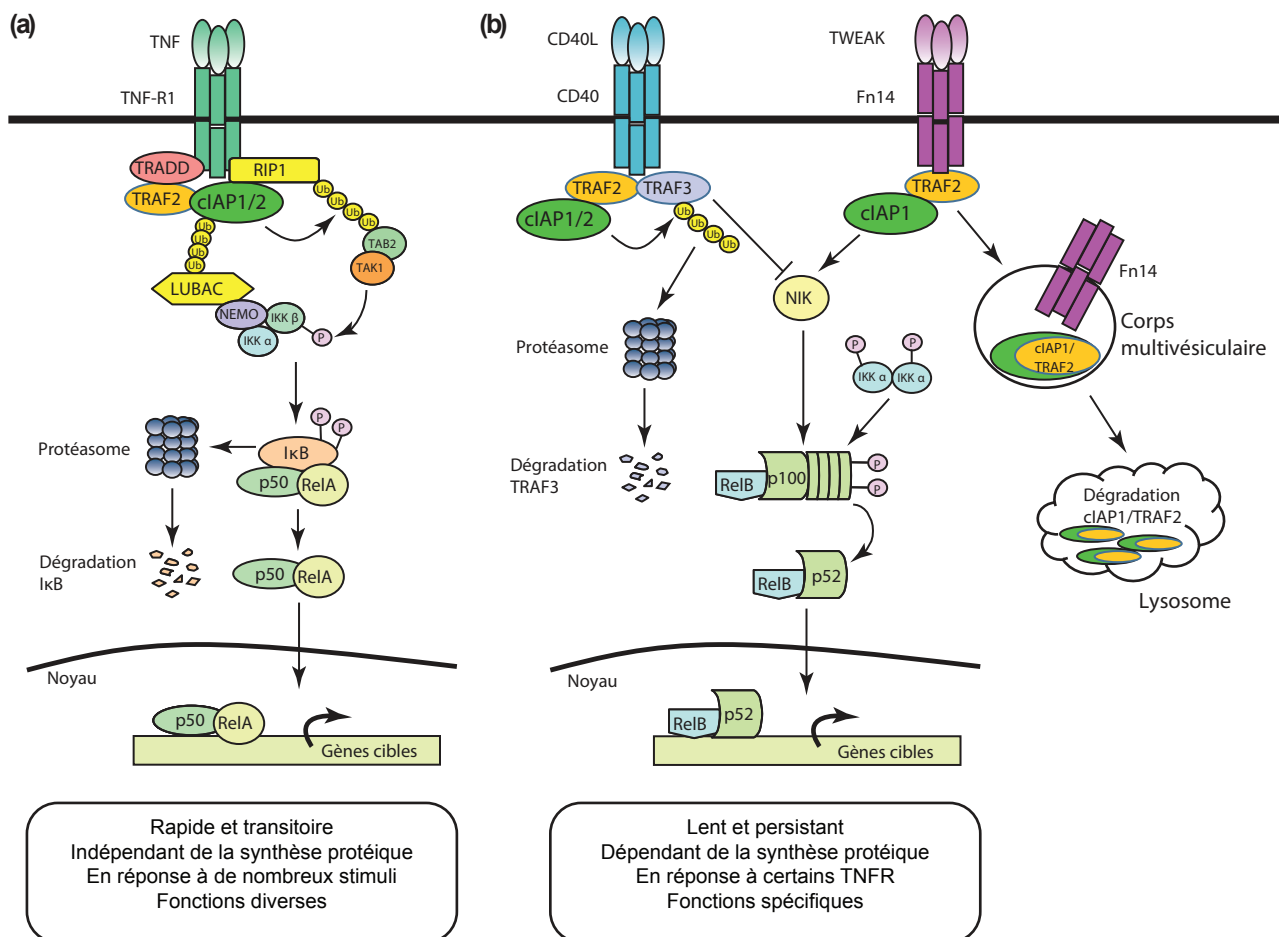
Là encore, XIAP lie les caspases effectrices via deux mécanismes :

- La poche hydrophobique du BIR2 de XIAP lie l'IBM de la grosse sous-unité des tétramères de caspases effectrices activées.
- La région en amont du BIR2 masque la poche de fixation du substrat des caspase-3 et -7, empêchant la fixation du substrat (Chai, Shiozaki et al. 2001, Riedl, Fuentes-Prior et al. 2001, Silke, Ekert et al. 2001, Tenev, Zachariou et al. 2005, Eckelman and Salvesen 2006).

Bien que l'activité E3 ubiquitine ligase de XIAP n'est pas indispensable à l'inhibition des caspases, l'analyse de cellules issues de souris transgéniques XIAP- $\Delta$ RING a mis en évidence l'importance des modifications post-traductionnelles dépendantes du RING dans l'inhibition de la caspase-3 par XIAP (Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008). L'expression de XIAP délété pour son domaine RING ne compense pas la perte de XIAP et l'augmentation de l'activité de la caspase-3 ainsi que l'apoptose dans les cellules souches et les thymocytes (Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008). De plus, XIAP peut induire une ubiquitination K48 des caspases actives conduisant à leur dégradation (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001), ainsi que la neddylation de la caspase-7 inhibant son activité (Broemer, Tenev et al. 2010).

cIAP1 et cIAP2 peuvent aussi interagir avec les caspase-3 et -7 via la liaison de l'IBM (Tenev, Zachariou et al. 2005). De plus, cIAP1 interagit avec le pro-domaine des caspases, indépendamment de leur IBM (Choi, Butterworth et al. 2009). Malgré leur incapacité à inhiber l'activité enzymatique des caspases (Eckelman and Salvesen 2006), les cIAP peuvent réguler la stabilité des tétramères de caspases actives via le système ubiquitine-protéasome (Tenev, Zachariou et al. 2005, Choi, Butterworth et al. 2009). cIAP2 est capable, au moins in vitro, d'induire une mono-ubiquitination non dégradative des caspase-3 et -7 (Huang, Joazeiro et al. 2000), suggérant un mécanisme de régulation par ubiquitination indépendant du protéasome.

Il a été clairement démontré que l'expression de cIAP1 et de cIAP2 protège les cellules de l'apoptose mais les mécanismes impliqués restent flous. Une hypothèse avancée est la liaison de SMAC par cIAP, libérant ainsi XIAP, lui permettant d'inhiber directement les caspases (Eckelman and Salvesen 2006). Une étude appuie cette hypothèse, en effet, une augmentation de l'expression de cIAP associée à une protection de l'apoptose en réponse à un stress du réticulum endoplasmique a été observée (Hamanaka, Bobrovnikova-Marjon et al. 2009). Les auteurs ont montré que cette augmentation d'expression de cIAP est associée à une augmentation de l'association de cIAP avec SMAC et au contraire à une diminution des complexes XIAP/SMAC.



**Figure 4: Régulation des voies classique et alternative de NF-κB par cIAP.** (a) Activation de la voie classique de NF-κB par le TNF-α. La fixation du TNF-α sur le TNFR1 entraîne la formation d'un complexe contenant, TRADD, TRAF2, LUBAC, RIP1, cIAP1, cIAP2. cIAP ubiquitinent RIP1 permettant le recrutement et l'activation de la kinase TAK1 ce qui permet la phosphorylation de IKK-β entraînant l'activation du complexe IKK qui va phosphoryler IκB entraînant sa dégradation. De cette façon, le dimère p50/RelA est libéré et va être transloqué dans le noyau où il activera la transcription de ses gènes cibles. (b) Activation de la voie alternative de NF-κB par le CD40L ou TWEAK. En l'absence de stimulation, la voie alternative de NF-κB est réprimée par la dégradation constitutive de NIK par TRAF2, TRAF3, cIAP1 et cIAP2. Après une stimulation par le CD40L, cIAP entraînent la dégradation protéasomale de TRAF3, stabilisant NIK. La fixation de TWEAK sur son récepteur Fn14 entraîne la stabilisation de NIK par l'internalisation et la dégradation lysosomale du complexe Fn14-cIAP1-TRAF2. Une fois stabilisé, NIK phosphoryle et active IKK-α qui entraîne le phosphorylation de p100 et son clivage en p52. Le dimère p52/RelB va être transloqué dans le noyau où il activera la transcription de ses gènes cibles (D'après Beug et al., 2012).

## **B) Régulation de la signalisation cellulaire par cIAP1 et 2.**

Bien qu'initialement décrites comme d'importants régulateurs de l'apoptose, les protéines de la famille des IAP s'avèrent aussi contrôler les voies de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et du NF- $\kappa$ B. Les premières études utilisant les Smac mimetics ont révélé que cIAP régulaient la mort cellulaire dépendante du TNF- $\alpha$  en contrôlant l'activation de NF- $\kappa$ B et le niveau d'ubiquitination de la kinase RIP1 (Petersen, Wang et al. 2007, Varfolomeev, Blankenship et al. 2007, Vince, Wong et al. 2007, Bertrand, Milutinovic et al. 2008). Par la suite, les études portant sur des KO de plusieurs IAP ont confirmé l'importance des IAP dans la régulation de ces voies de signalisation (Gardam, Turner et al. 2011, Vince, Wong et al. 2012).

### **1. La voie NF- $\kappa$ B**

Le rôle de cIAP dans la régulation de NF- $\kappa$ B est très bien décrit (Gyrd-Hansen and Meier 2010, Beug, Cheung et al. 2012). NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription activé par la stimulation de récepteurs d'antigènes ou de cytokines, l'activation de TLR (Toll Like Receptors) par des molécules bactériennes, l'activation de NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins) ou des NLR (NOD-like receptors) et également en réponse à des stress intra-cellulaires comme l'endommagement de l'ADN ou les ROS (Reactive Oxygen Species).

NF- $\kappa$ B est important pour la réponse adaptative des cellules en régulant la production de molécules pro-inflammatoires et en régulant l'expression de gènes importants pour la survie cellulaire, la différenciation et la prolifération (Hayden and Ghosh 2012).

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un hétéro-dimère composé d'une sous-unité Rel (RelA, RelB ou c-Rel) et une sous unité NF- $\kappa$ B (la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B1 ou la sous-unité p52 de NF- $\kappa$ B2). Deux voies signalétiques distinctes permettent l'activation de NF- $\kappa$ B : la voie dite « classique » et la voie dite « alternative » (*Figure 4 : Régulation des voies classique et alternative de NF- $\kappa$ B par cIAP*).

#### **1.i Régulation de la voie classique de NF- $\kappa$ B par cIAP.**

Dans la voie classique de NF- $\kappa$ B, le dimère p50/RelA est séquestré dans le cytoplasme par son interaction avec I $\kappa$ B (Inhibitor of NF- $\kappa$ B). En réponse à un stimulus comme la fixation d'un ligand sur le TNFR1 par exemple, I $\kappa$ B- $\alpha$  (Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha) est dégradé, libérant le dimère p50/RelA et permettant ainsi sa translocation nucléaire nécessaire à la stimulation de la transcription de gènes pro-inflammatoires. La dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  nécessite sa phosphorylation par le complexe IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$  (I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase Kinase  $\alpha,\beta,\gamma$ ) qui est activée par son ubiquitination par LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) et la phosphorylation par TAK1 (TGF $\beta$ -activated protein kinase 1) (Hayden and Ghosh 2012).

Les protéines cIAP permettent la proximité stérique de TAK1, LUBAC et IKK. Elles sont recrutées avec RIP1 au niveau des complexes des récepteurs TNFR (Haas, Emmerich et al. 2009) grâce à leur association avec l'adaptateur moléculaire TRAF2 (Tumor necrosis factor Receptor

Associated Factor 2). cIAP catalysent leur auto-ubiquitination et la poly-ubiquitination K63 non dégradative de RIP1 (Bertrand, Milutinovic et al. 2008, Varfolomeev, Goncharov et al. 2008, Dynek, Goncharov et al. 2010). Ces chaînes d'ubiquitines sont reconnues par les domaines de reconnaissance de l'ubiquitine (UBD) des complexes I $\kappa$ B Kinase : IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$  et TAK1/TAB2/TAB3. Le rapprochement stérique de ces deux plateformes permet la phosphorylation de IKK $\beta$  par TAK1 qui induit la séquence phosphorylation/ubiquitination/dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  (Bertrand, Milutinovic et al. 2008, Haas, Emmerich et al. 2009, Damgaard, Nachbur et al. 2012, Varfolomeev, Goncharov et al. 2012).

Récemment, il a été montré que les chaînes d'ubiquitines présentes sur cIAP1 permettent aussi le recrutement du complexe LUBAC composé de HOIL/HOIP/SHARPIN (Haas, Emmerich et al. 2009) responsable de l'ubiquitination linéaire d'IKK $\gamma$  (Tokunaga, Sakata et al. 2009) ainsi que de RIP1 (Gerlach, Cordier et al. 2011, Ikeda, Deribe et al. 2011, Tokunaga, Nakagawa et al. 2011). Ces chaînes d'ubiquitines linéaires sont des plateformes de choix pour IKK $\gamma$  ce qui favorise l'activation de NF- $\kappa$ B1.

Les protéines cIAP peuvent également réguler l'activation de NF- $\kappa$ B grâce à la mono-ubiquitination de IKK $\gamma$  qui est nécessaire à l'activation du complexe IKK (Jin, Lee et al. 2009, Hinz, Stilmann et al. 2010).

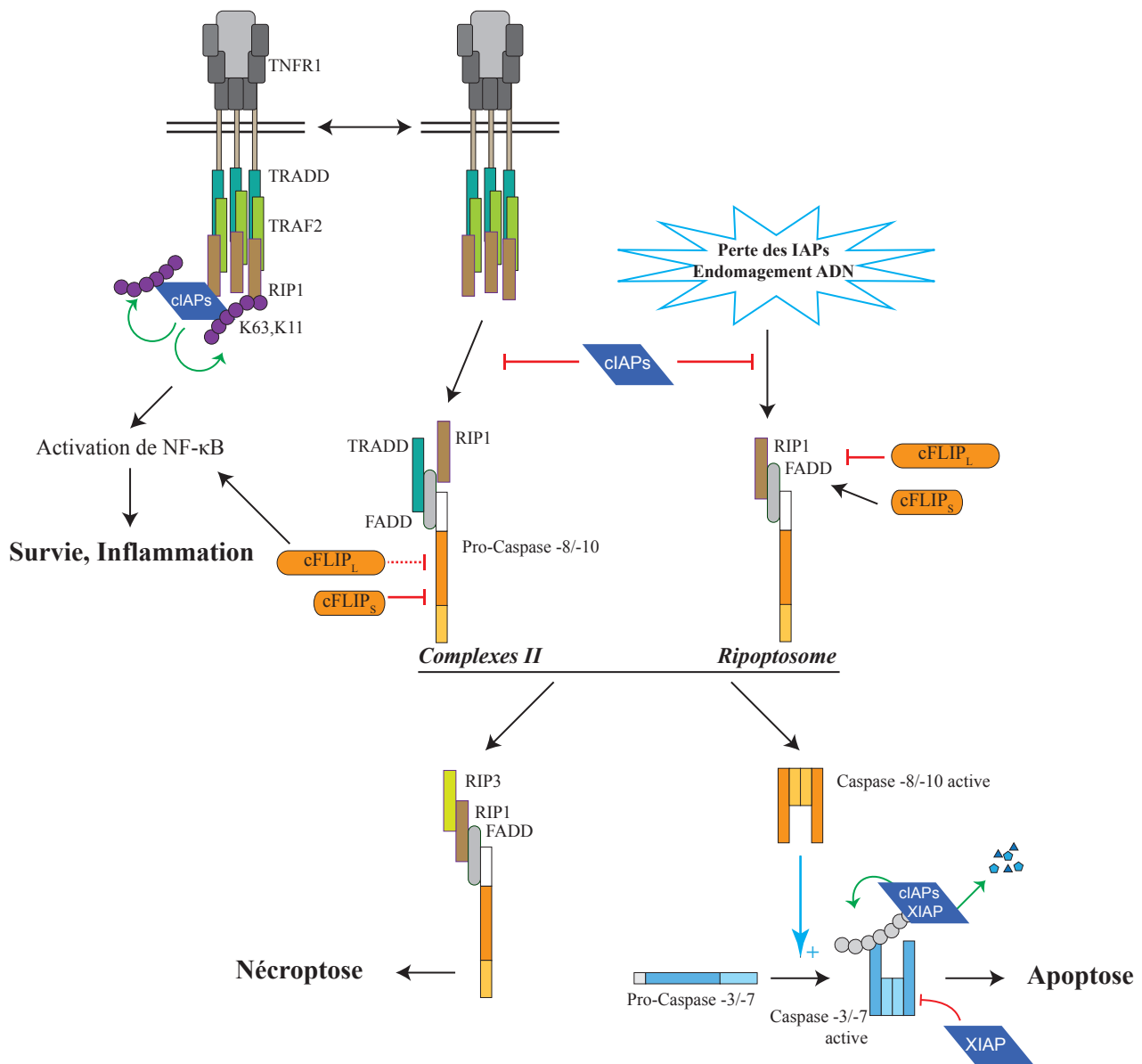
#### 1.ii Régulation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B par cIAP.

L'activation alternative de NF- $\kappa$ B survient majoritairement dans les cellules lymphoïdes en réponse au CD40L (Cluster of differentiation 40 Ligand), BAFF (B-cell activating factor) ou TWEAK (Tumor Necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis). Cette voie de signalisation implique la kinase NIK qui catalyse la phosphorylation activatrice de IKK $\alpha$ . En retour, IKK $\alpha$  phosphoryle le précurseur NF- $\kappa$ B2 p100 permettant son activation protéolytique en p52 (*Figure 4*). Les IAP contrôlent la stabilité et le niveau d'expression de NIK. En absence de stimulation, les protéines cIAP, TRAF2 et TRAF3 bloquent la voie alternative de NF- $\kappa$ B en induisant une ubiquitination dégradative de NIK (Vallabhapurapu, Matsuzawa et al. 2008, Zarnegar, Wang et al. 2008, Feltham, Moulin et al. 2010, Mao, Li et al. 2010, Varfolomeev, Goncharov et al. 2012). Lors de la stimulation du CD40, cIAP entraînent la poly-ubiquitination dégradative de TRAF3 qui ne peut plus adresser NIK au protéasome, levant ainsi son inhibition. Lors d'une stimulation par TWEAK, l'intégration et la dégradation lysosomale du récepteur de TWEAK, Fn14 (FGF-inducible 14) avec cIAP1 et TRAF2 permet de lever l'inhibition de NIK (Vince, Chau et al. 2008).

#### 2. Régulation de la kinase RIP par cIAP.

Les kinases à sérine/thréonine de la famille RIP sont d'importants régulateurs de la réponse adaptative au stress cellulaire causée par les infections par des pathogènes, l'inflammation ou le stress génotoxique (Declercq, Vanden Berghe et al. 2009). Elles sont déterminantes dans la





**Figure 5: Régulation des plateformes activatrices des caspases contenant RIP par cIAP.** La stimulation du TNFR1 entraîne le recrutement au récepteur de cIAP et RIP1 via les protéines adaptatrices TRADD et TRAF2. cIAP catalysent leur auto-ubiquitination K63 ainsi que l'ubiquitination K11 et K63 de RIP1 permettant l'activation de NF-κB et la survie des cellules. En l'absence de cIAP, le complexe-II est formé entraînant la mort des cellules. Une plateforme cytoplasmique contenant RIP1, le Ripoptosome, peut également se former en l'absence de la stimulation des récepteurs de mort, en réponse à des endommagements de l'ADN entraînant la perte d'expression des IAP ou l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des IAP entraînant leur dégradation. Ces plateformes contenant RIP1 peuvent activer les caspases-8 ou -10 activant l'apoptose ou entraîner la mort cellulaire indépendante des caspases, la nécroptose. Le contrôle de la mort cellulaire par le IAP se fait à différents niveaux : cIAP entraînent l'ubiquitination K11 et K63 de RIP1 activant NF-κB et bloquant la formation du complexe-II. cIAP et XIAP entraînent l'ubiquitination K48 de RIP1 entraînant sa dégradation protéasomale. XIAP peut directement inhiber l'activité des caspases effectrices -3 ou -7 activées. cIAP et XIAP peuvent induire la dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine des caspase-3 et -7 actives (D'après Berthelet. and Dubrez., 2013).



transmission de signaux de survie ou de différenciation ainsi que dans l'activation des voies de signalisation de mort cellulaire.

L'activité des protéines RIP est contrôlée par des processus d'ubiquitination. Parmi les E3 ubiquitine ligase de RIP, nous retrouvons les protéines IAP et TRAF. Récemment, l'analyse de souris doubles KO *ciap1/xiap* et *ciap1/ciap2* a montré l'importance des IAP dans la régulation de la mort induite par RIP1. La délétion simultanée de *ciap1* avec *ciap2* ou *xiap* entraîne une létalité embryonnaire qui est annulée ou retardée par l'hémizygotie pour *rip1* (Moulin, Anderton et al. 2012).

La protéine RIP peut être activée indépendamment ou non d'une stimulation des récepteurs de mort. Nous verrons ici que cIAP régulent cette activation dans les deux cas de figure.

### 2.i Activation de RIP dépendante des récepteurs de mort.

RIP1 intervient dans la voie de signalisation du TNF. Il possède un domaine DD (death domain) retrouvé dans les récepteurs de mort Fas, Fas, TRAIL-R1 et TRAIL-R2, les protéines adaptatrices TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein), FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et RAIDD. RIP1 est recruté sur le TNFR1 via TRADD et subit ensuite des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination qui déterminent ses fonctions moléculaires. Comme décrit dans la partie précédente, les protéines RIP sont des cibles d'ubiquitination de cIAP qui peuvent conjuguer des molécules d'ubiquitine de type K48 conduisant à la dégradation des protéines et des chaînes d'ubiquitines de type K11, K63 ou linéaires modifiant leur activité (Park, Yoon et al. 2004, Bertrand, Milutinovic et al. 2008, Varfolomeev, Goncharov et al. 2008, Geserick, Hupe et al. 2009, Dynek, Goncharov et al. 2010, Bertrand, Lippens et al. 2011, Tenev, Bianchi et al. 2011). L'ubiquitination K11 et K63 de RIP1 par cIAP1 est nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B suite à une stimulation des TNFR (Bertrand, Milutinovic et al. 2008, Varfolomeev, Goncharov et al. 2008, Dynek, Goncharov et al. 2010, Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2011). En absence de cIAP, RIP1 non ubiquitiné est recruté au sein d'un complexe protéique cytoplasmique, le complexe-II, contenant la protéine FADD qui pourra activer la caspase-8 entraînant la mort cellulaire (Micheau and Tschopp 2003) (Figure 5 : Régulation des plateformes activatrices des caspases contenant RIP par cIAP). cIAP1 inhibe la formation d'un complexe secondaire également après stimulation de TRAILR et CD95 (Geserick, Hupe et al. 2009). Ces plateformes moléculaires contenant RIP1 peuvent induire la mort par apoptose ou une mort indépendante de l'activité des caspases, la nécroptose, qui dépend de la présence de RIP3, cFLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) et de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010). La protéine c-FLIP existe sous trois isoformes : c-FLIP<sub>L</sub> (55 kDa), c-FLIP<sub>S</sub> (26 kDa) et c-FLIP<sub>R</sub> (24 kDa). c-FLIP<sub>S</sub> forme des hétérodimères avec la pro-caspase-8 et inhibe son activité alors que c-FLIP<sub>L</sub> en complexe avec la caspase-8 permet son activation mais la séquestre au niveau du récepteur limitant ainsi son activité et stabilisant le complexe I (Shirley and Micheau 2013). Cet hétérodimère peut alors cliver

des cibles proches comme RIP1, FLIP lui-même ou une autre caspase-8 (Micheau, Thome et al. 2002, Feoktistova, Geserick et al. 2011). Le clivage de FLIP génère dans ce cas le fragment p22-FLIP capable d'interagir avec le complexe IKK entraînant l'activation de NF- $\kappa$ B (Golks, Brenner et al. 2006). Deux études publiées dans le journal *Nature* en 2011 ont étudié le rôle de ce complexe FLIP-caspase-8 dans l'inhibition de la mort induite par RIP3. Les chercheurs ont développé un modèle de souris délétées pour la caspase-8 et RIP3. La perte d'expression de la caspase-8 est létale au stade embryonnaire mais cette létalité est abolie par la déplétion simultanée de RIP3, indiquant un rôle de la caspase-8 dans l'inhibition de la nécroptose dépendante de RIP3 (Kaiser, Upton et al. 2011). Il a alors été montré que l'hétérodimère FLIP<sub>L</sub>-caspase-8 catalytiquement actif inhibe l'association de FADD, RIP1 et RIP3 bloquant la nécroptose sans enclencher l'apoptose.

### 2.ii Activation de RIP indépendante des récepteurs de mort.

Récemment un nouveau complexe contenant RIP1 a été identifié : le RIPoptosome (Feoktistova, Geserick et al. 2011, Tenev, Bianchi et al. 2011) formé par les protéines RIP1, FADD, la caspase-8 et FLIP. Il a été démontré que ce complexe se forme et induit la mort des cellules par apoptose ou nécroptose après déplétion ou inactivation des IAP suite à un stress génotoxique, un relargage des inhibiteurs des IAP ou un traitement par des smacs mimétiques. XIAP, cIAP1 et cIAP2 peuvent tous trois contrôler la formation constitutive du ripoptosome. Comme le complexe-II, il peut entraîner la mort des cellules par apoptose ou par nécroptose selon le type cellulaire. (Darding and Meier 2012). Les mécanismes impliqués dans la régulation de la formation du ripoptosome par les IAP ne sont pas encore clairement établis et font l'objet de nombreux travaux. Il semble que la conjugaison de chaînes d'ubiquitine sur RIP1 permet de bloquer la formation de ce complexe. Plusieurs hypothèses sont étudiées, l'ubiquitination de RIP1 pourrait inhiber l'activité kinase de RIP1 nécessaire à son association avec la caspase-8. Dans les cellules tumorales, une faible proportion de RIP1 pourrait être adressée au protéasome (Imre, Larisch et al. 2011, Tenev, Bianchi et al. 2011). La protéine c-FLIP joue également un rôle important dans la régulation du ripoptosome. En effet, c-FLIP peut être recruté au sein du ripoptosome et le régule différemment selon l'isoforme impliquée. L'hétérodimère FLIP<sub>L</sub>-caspase-8 permet le clivage de RIP1 et la dissociation du ripoptosome et au contraire, le complexe FLIP<sub>S</sub>-caspase-8 inactif favorise la formation du ripoptosome (Feoktistova, Geserick et al. 2011, Tenev, Bianchi et al. 2011) (*Figure 5*).

### 3. Régulation des TLR par cIAP.

Les récepteurs TLR reconnaissent des motifs conservés chez les bactéries et d'autres organismes. L'activation du TLR4 par le LPS (lipopolysaccharide) induit le recrutement sur le récepteur des protéines adaptatrices TIRAP (Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein) et MyD88 (MYeloid Differentiation primary response gene 88) permettant la phosphorylation de IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) et la poly-ubiquitination de TRAF6. Ensuite, le complexe TAB2/3-TAK1 (TGF-beta Activated Kinase 1/MAP3K7 binding

protein 2/3 – Transforming growth factor-beta-Activated Kinase 1) est recruté et va activer le complexe IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$  qui pourra activer à son tour NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires. Le complexe du récepteur TLR4 stimule via TRAF6 la poly-ubiquitination de type K63 de cIAP. Cette ubiquitination active cIAP qui lie des chaînes d'ubiquitine K48 à TRAF3 l'adressant au protéasome. Cette dégradation protéasomale de TRAF3 empêche l'inhibition de TAK1 lui permettant d'activer la voie MAPK et la production de cytokines pro-inflammatoires (Tseng, Matsuzawa et al. 2010, Beug, Cheung et al. 2012).

#### 4. Régulation de la voie NOD par cIAP.

Les protéines NLR telles que NOD1 et NOD2 sont des détecteurs cytoplasmiques de peptidoglycanes bactériens et sont impliquées dans la régulation de l'apoptose et la réponse pro-inflammatoire. La détection de pathogènes intracellulaires entraîne l'oligomérisation des protéines NOD permettant l'activation des voies MAPK et NF- $\kappa$ B. Après stimulation par un ligand, les protéines NOD permettent la mise en place d'un complexe comprenant NOD1, NOD2, RIP2, cIAP1, cIAP2 et XIAP (Bertrand, Doiron et al. 2009, Krieg, Correa et al. 2009, Damgaard, Nachbur et al. 2012). cIAP1 et cIAP2 lient et ubiquitinent RIP2 en K63 (Yang, Yin et al. 2007) ce qui permet le recrutement des complexes LUBAC et TAK1-TAB au niveau de RIP2 permettant l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK.

#### **C) Les fonctions nucléaires de cIAP1.**

La localisation de cIAP1 est nucléaire dans de nombreux modèles cellulaires contrairement à cIAP2 et XIAP qui sont eux majoritairement cytoplasmiques (Liston, Fong et al. 2001, Ponnelle, Chapusot et al. 2003, Plenchette, Cathelin et al. 2004, Samuel, Okada et al. 2005). Malgré cette localisation, peu de fonctions nucléaires ont été attribuées à cIAP1. Les travaux menés dans mon équipe d'accueil ont montré que cIAP1 était nucléaire dans les cellules non différenciées en phase de prolifération et était exclu du noyau lors de la différenciation. Cette exclusion coïncide avec l'arrêt de prolifération associé à la différenciation, suggérant une fonction nucléaire de cIAP1 dans la prolifération (Plenchette, Cathelin et al. 2004, Didelot, Lanneau et al. 2008). Une étude menée par John Reed en 2005 a montré que cIAP1 est localisé dans le noyau des cellules en interphase (Samuel, Okada et al. 2005). Lors de la télophase, cIAP1 est localisé au niveau d'une structure circulaire appelée anneau de corps intermédiaire associée aux microtubules et reliant les deux cellules filles à la fin de la cytotélerèse. Une surexpression de cIAP1 favorise l'apparition de cellules polyploïdes après un traitement par des poisons du fuseau mitotique, suggérant un défaut de la cytotélerèse. Cette observation a été expliquée par une interaction cIAP1 - Survivine, cette dernière étant un régulateur important de la cytotélerèse.

Une seconde étude en 2007 a montré que cIAP1 était capable d'ubiquitiner et de dégrader Mad1 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein 1) l'inhibiteur de l'oncogène c-Myc. La protéine c-Myc ainsi libérée pourra stimuler le cycle cellulaire et activer la prolifération. Dans la mesure où

le complexe Myc-Mad1 est retrouvé dans le noyau des cellules, on peut donc supposer que cette fonction de cIAP1 soit plutôt nucléaire, bien que la localisation de cIAP1 dans ce contexte n'ait pas été étudiée. Ce rôle de cIAP1 dans la régulation de c-Myc pourrait en partie expliquer les propriétés oncogéniques de cIAP1 observées dans un modèle de carcinome hépatique murin induit par la délétion de p53 associée à une surexpression de c-Myc (Xu, Zhu et al. 2007).

Nos travaux ont montré que cIAP1, lorsqu'il est nucléaire, est capable de réguler le facteur de transcription E2F1 (voir partie résultats).

#### **D) Régulation de la migration cellulaire par les IAP.**

Les premières observations concernant la régulation de la migration cellulaire par les IAP ont été faites chez la drosophile en 2004 (Geisbrecht and Montell 2004). Par un criblage génétique, les auteurs ont montré qu'une surexpression de DIAP1 permettait de compenser la perte de fonction de la RhoGTPase Rac1 dans la migration des cellules de bordure de l'ovocyte. Cette fonction de DIAP1 nécessite la présence des domaines BIR mais ne requiert pas la présence du domaine RING. Bien que les mécanismes de régulation de la migration par DIAP1 n'aient pas été décrits, les auteurs ont montré la formation d'un complexe in-vitro contenant DIAP1, Rac1, un régulateur du cytosquelette d'actine de la famille des RhoGTPases et la profiline, une protéine qui régule la quantité de G-actine libre. L'influence des IAP sur la migration cellulaire a ensuite été étudiée chez l'homme avec des résultats contradictoires :

- XIAP et cIAP1 semblent aussi capables de stimuler la migration de lignées d'adénocarcinomes mammaires (MDA-MB-231), prostatiques (PC3) et coliques (HCT116) mais aussi de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Mehrotra, Languino et al. 2010, Liu, Zhang et al. 2011, Lopez, John et al. 2011). Plusieurs modes d'action des IAP sur la migration ont été décrits. Dans un premier travail cette fonction a été associée à une activation de NF- $\kappa$ B en réponse à la formation d'un complexe XIAP/Survivine. L'activation de NF- $\kappa$ B entraînant une sécrétion de fibronectine, reconnue par les intégrines qui augmentent les propriétés migratoires des cellules tumorales (Mehrotra, Languino et al. 2010). Une autre étude a associé cette fonction des IAP à leur capacité à réguler RhoGDI (Rho GDP-dissociation Inhibitor), un régulateur des petites protéines G de la famille Rho qui régulent le cytosquelette d'actine. En se liant à RhoGDI, XIAP empêcherait sa sumoylation nécessaire pour son activité dans la répression de la motilité cellulaire (Liu, Zhang et al. 2011). L'équipe de Meier a également observé que cIAP1 et son mutant  $\Delta$ CARD stimule la migration de fibroblastes de souris embryonnaires cIAP1<sup>-/-</sup>cIAP2<sup>-/-</sup>, cet impact sur la migration étant lié à la régulation négative de RIP1 par cIAP1 (Lopez, John et al. 2011).
- Bien qu'un niveau élevé des IAP puisse stimuler la migration cellulaire, l'équipe de Rajalingam a démontré que XIAP, cIAP1 et cIAP2 peuvent réprimer les propriétés migratoires de cellules Hela induites par l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Dogan, Harms et al. 2008). Ils ont montré que XIAP, cIAP1 et cIAP2 sont nécessaires à la formation d'un complexe qui stimule la dégradation de c-RAF, une kinase contrôlant l'activation de ERK ainsi que la migration cellulaire. Cette même équipe a établi un lien direct entre IAP et RhoGTPases. Ils ont montré que les IAP sont des E3 ubiquitine ligase de la RhoGTPase Rac1. En effet, XIAP, cIAP1 et cIAP2 lient directement Rac1 et catalysent sa poly-ubiquitination contrôlant ainsi sa stabilité. Un traitement par les antagonistes des IAP empêche l'ubiquitination dégradative de Rac1, provoquant un gain de fonction de cette

GTPase qui se caractérise par des modifications morphologiques ainsi qu'une augmentation des propriétés migratoires des cellules (Oberoi, Dogan et al. 2012).

IAPs & cellular IAP antagonists	Tumors
IAPs:	
clAP1&clAP2 over-expression (amplicon 11q21-22)	Cervical cancer, esophageal squamous cell carcinoma, hepatocarcinoma, Meduloblastoma, Non-small and small cell lung cancer, Oral squamous cell carcinoma, Pancreatic cancer
clAP1 over-expression independently from amplicon 11q21-22	B-cell chronic lymphocytic leukemia, Bladder Carcinoma, Cervical Carcinoma, Chronic lymphocytic leukemia, Colorectal Cancer, Head and Neck Squamous cell carcinoma, Non-small and small cell lung cancer, Prostate Carcinoma, Squamous carcinoma of Tongue
clAP2 over-expression independently from amplicon 11q21-22	Breast Cancer, Cervical Carcinoma, Chronic lymphocytic leukemia, Colorectal Carcinoma, Prostate Carcinoma
clAP2/MALT chimeric protein t(11,18)(q21,q21)	MALT Myeloma
clAP1/clAP2 inactivation	Multiple Myeloma
Cellular IAP antagonists:	
Smac down-regulation	Acute myeloid leukemia, Bladder Carcinoma, Breast Carcinoma, Cervical Carcinoma CLL, Colorectal Carcinoma, Endometrioid endometrial Cancer, Esophageal carcinoma Lung Cancer, Rectal Adenocarcinoma, Testicular Cancer
Smac over-expression	Bladder Cancer, Gastric Adenocarcinoma, Renal Adenocarcinoma
HtrA2 over-expression	Endometrial Cancer, Gastric Carcinoma, Ovarian Cancer, Prostate Carcinoma, Renal Carcinoma, Stomach Cancer, Thyroid Cancer
HtrA2 down-regulation	Acute myeloid leukemia, Endometrial Cancer, Ovarian Cancer, Testicular Cancer
ARTS over-expression	Astrocytoma
ARTS down-regulation	Acute myeloid leukemia
Ratio IAP /IAP antagonists:	
increased clAP1/HtrA2 & clAP1/Smac	Chronic lymphocytic leukemia

**Tableau 1: Niveau d'expression des différents IAP et leurs antagonistes dans les tumeurs humaines (Dubrez et al., 2013).**

#### IV) Propriétés oncogéniques de cIAP.

##### A) Modification de l'expression de cIAP dans les tumeurs et démonstration de leur propriétés oncogéniques.

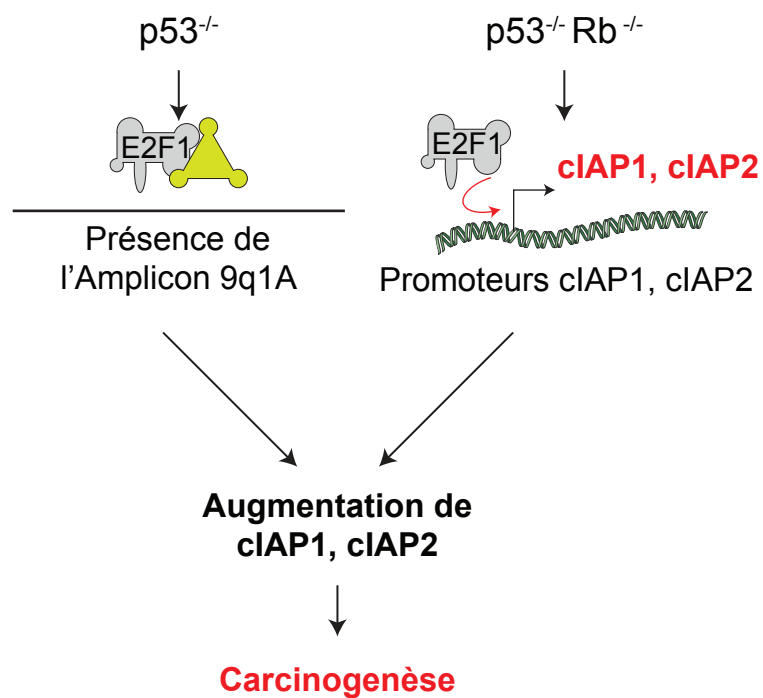
Les gènes codant cIAP1 et cIAP2 (birc2 et birc3) sont localisés sur le locus q21-22 du chromosome 11, une région amplifiée (amplicon 11q21-22) dans de nombreux échantillons tumoraux d'origines différentes : poumon (Dai, Zhu et al. 2003), foie (Zender, Spector et al. 2006), ovaires (Zender, Spector et al. 2006), carcinome mammaire (Cheng, Zhou et al. 2010), pancréas (Bashyam, Bair et al. 2005), ORL (Snijders, Schmidt et al. 2005), médulloblastome (Reardon, Michalkiewicz et al. 1997), glioblastome (Weber, Sommer et al. 1996), col de l'utérus (Imoto, Tsuda et al. 2002), œsophage (Imoto, Yang et al. 2001). Une surexpression de cIAP est aussi retrouvée indépendamment de la présence de l'amplicon 11q21-22 dans de nombreux cancers d'origines différentes (Tableau 1 : Niveau d'expression des différents IAP et leurs antagonistes dans les tumeurs humaines).

Le niveau d'expression des IAP a été corrélé à un mauvais pronostic dans la leucémie lymphoïde chronique (Grzybowska-Izydorczyk, Cebula et al. 2010), dans la leucémie aiguë de lignée mixte (Nakagawa, Hasegawa et al. 2005) et dans le cancer de la vessie (Che, Yang et al. 2012). La localisation nucléaire de cIAP1 est également associée à un mauvais pronostic dans les cancers de la vessie (Che, Yang et al. 2012), cancers colorectaux (Ponnelle, Chapusot et al. 2003) et les cancers de la tête et du cou (Tanimoto, Tsuda et al. 2005). En plus d'une dérégulation de l'expression des IAP, l'expression de leurs antagonistes tels que Smac, HtrA2 ou ARTS peut également être altérée dans des échantillons tumoraux (Tableau 1).

Chez la souris une amplification récurrente du locus 9qA1 (équivalent au 11q21-22 chez l'homme) et des propriétés oncogéniques de cIAP1 ont été clairement démontrées dans des ostéosarcomes p53<sup>-/-</sup> (Ma, Cai et al. 2009), hépatocarcinomes p53<sup>-/-</sup> / Myc (Zender, Spector et al. 2006) et carcinomes mammaires p53<sup>-/-</sup> Rb<sup>-/-</sup> (Retinoblastoma protein) (Cheng, Zhou et al. 2010). Dans ces modèles, des niveaux élevés de cIAP1 et cIAP2 sont nécessaires à la croissance des tumeurs, démontrant ainsi le caractère oncogénique de ces protéines.

Dans l'étude de Zender et al. menée en 2006, un modèle de carcinome hépatocellulaire murin a été développé en transformant des hépatoblastes de foie fœtal isolés de souris p53<sup>-/-</sup> par Myc, Akt activé (Akt1) ou la forme oncogénique de HRas (HRasV12). Une étude approfondie du génome des tumeurs formées lors de la transplantation de ces cellules dans des foies de souris porteuses a permis d'identifier, dans les tumeurs transformées par Myc, l'amplicon 9qA1. Cet amplicon code pour les protéines cIAP1/2 et le facteur de transcription Yap. L'équivalent humain de cet amplicon, l'amplicon 11q21-22 est notamment retrouvé dans les hépatocarcinomes humains. La surexpression de cIAP1 et de Yap a ensuite été confirmée dans les échantillons





**Figure 6: Propriétés oncogéniques de cIAP dans un modèle de carcinome mammaire murin.** Le développement des cancers est initié par la délétion de p53, dans ce cas, on retrouve l'amplicon 9q1A et une augmentation d'expression de cIAP. La présence de cet amplicon est compensée par la délétion de Rb, dans ce cas, l'activation incontrôlée de E2F1 entraîne l'augmentation d'expression de cIAP. Dans tous les cas, l'augmentation de cIAP est importante pour la carcinogenèse, indépendamment ou non de la présence de l'amplicon 9q1A (Cheng et al., 2010).

murins et humains. L'utilisation de shRNA spécifiques de cIAP1 et/ou de Yap a ensuite démontré des propriétés oncogéniques individuelles ainsi que leur synergie dans le développement de tumeurs. Il est intéressant de noter qu'une surexpression de la cycline E est observée dans ces échantillons tumoraux (Zender, Spector et al. 2006).

L'étude de Ma et al. en 2009 s'est intéressée aux ostéosarcomes. Pour cette étude, un modèle murin p53<sup>+/-</sup> qui développe fréquemment des ostéosarcomes a été utilisé. Le but de l'étude était d'identifier des événements associés à la délétion de p53 dans le développement d'ostéosarcomes. Dans les échantillons tumoraux, l'amplicon 9q1A est fréquemment retrouvé. L'utilisation de shRNA spécifiques de cIAP1 ou cIAP2 a démontré leurs propriétés oncogéniques, associées à une diminution de l'apoptose des cellules surexprimant ces protéines. Contrairement à l'étude de Zender et al., dans ce modèle, la diminution d'expression de Yap n'a pas d'effet sur la croissance des tumeurs (Ma, Cai et al. 2009).

Dans une étude menée par Cheng et al. en 2010, un modèle de KO conditionnel de p53 et/ou de Rb dans l'épithélium mammaire des souris a été développé. Une analyse des génomes des tumeurs obtenues a mis en évidence la présence de l'amplicon 9q1A dans les tumeurs déficientes en p53, en revanche, lorsque Rb est également inactivé, l'amplicon n'est plus retrouvé, suggérant que la surexpression de Rb compense l'amplification de cIAP1, cIAP2 et Yap. De plus, une inactivation de Rb est associée à une augmentation de l'expression de cIAP1 et cIAP2 dans les tumeurs. Dans des lignées cellulaires dérivées de l'épithélium mammaire des souris, un siRNA dirigé contre E2F1 diminue l'expression de cIAP1 et cIAP2. Des sites de fixation E2F sont présents dans les promoteurs de cIAP1, cIAP2 et Yap et un contrôle transcriptionnel positif de ces trois protéines par E2F1 a été démontré. Ceci suggère donc que la dérégulation de la voie E2F/Rb permet la surexpression de cIAP1 et cIAP2 indépendamment de la présence de l'amplicon 9q1A. Cette étude met donc en évidence l'importance de la surexpression de cIAP1 et cIAP2 dans ce modèle, qu'elle soit due à la présence de l'amplicon 9q1A ou à la perte de contrôle de E2F1 via l'inactivation de Rb (Figure 6 : Propriétés oncogéniques de cIAP dans un modèle de carcinome mammaire murin.) (Cheng, Zhou et al. 2010).

## **B) Le cas du lymphome de MALT.**

Le lymphome de MALT (Mucosal-Associated Lymphoid Tumors) représente 30% des lymphomes non-hodgkinien à cellules B. Il se caractérise par une infection chronique des poumons ou du tractus gastrique. L'aberration chromosomique prévalente est une translocation réciproque des gènes Birc3 et Malt1 (t(11q21:18q21)) (Zhou, Du et al. 2005) qui génère une protéine de fusion composée des domaines BIR de cIAP2 et de la partie C-terminale de la protéine MALT1. Cette protéine induit une activation constitutive de la signalisation NF-κB impliquée dans la transformation et la progression de ce lymphome.

### **C) cIAP et métastases.**

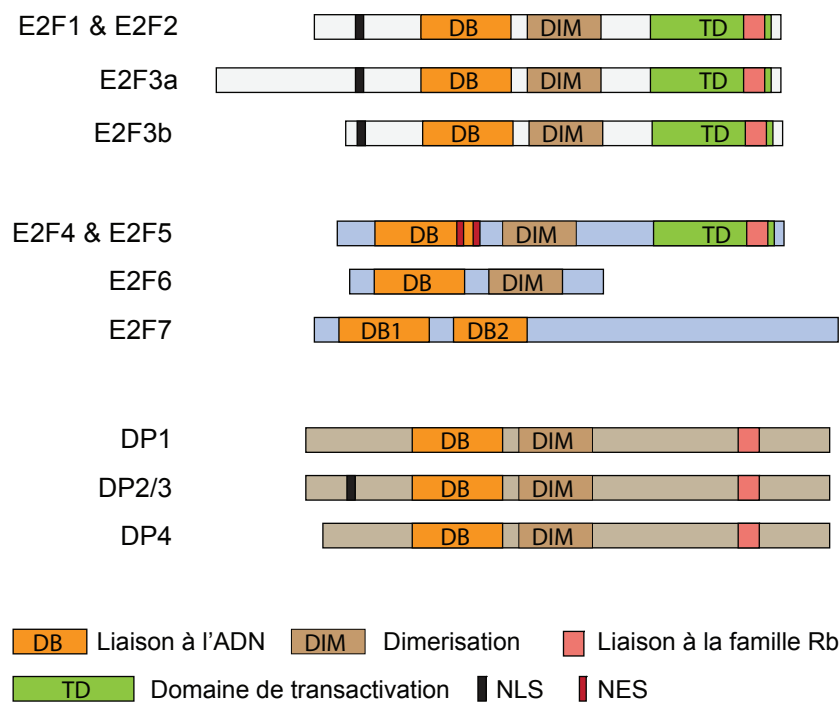
Dans une étude menée en 2005, dans un modèle de carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou, l'expression nucléaire de cIAP1 a été associée à la formation de métastases ainsi qu'à un état avancé de la maladie (Tanimoto, Tsuda et al. 2005). En 2008, dans un modèle de carcinome à cellules squameuses de la langue, l'expression de cIAP1 à la fois nucléaire et cytoplasmique a été corrélée avec la formation de métastases ainsi qu'à une augmentation de la prolifération des cellules et une diminution de l'activation de la caspase -3 (Qi, Mogi et al. 2008). Ces observations confirment les résultats obtenus dans un modèle de cancer à cellules squameuses métastatiques murin, où une analyse du profil d'expression des cellules avait mis en évidence une surexpression de cIAP1 (Dong, Loukinova et al. 2001).

Dans les cellules de cholangiocarcinome, un traitement par TRAIL n'induit pas la mort des cellules mais au contraire stimule leur oncogénicité et particulièrement leur capacité de migration et d'invasion via l'activation de NF- $\kappa$ B. Lorsque ces cellules sont traitées par le JP1584, un mimétique de Smac inhibant cIAP1 et cIAP2, avant une stimulation par TRAIL, les cellules ne meurent pas mais l'activation de NF- $\kappa$ B est diminuée ainsi que la formation de métastases extra-hépatiques (Fingas, Blechacz et al. 2010).

### **D) cIAP comme suppresseurs de tumeurs.**

Bien que les propriétés oncogéniques de cIAP aient été largement documentées, il existe certains cas, particulièrement dans les leucémies, où les protéines cIAP se comportent comme des suppresseurs de tumeurs. C'est le cas des myélomes multiples dont 20% sont liés à une activation constitutive de la voie non-canonique de NF- $\kappa$ B. Ces cellules tumorales présentent des altérations génétiques sur les gènes codant pour cIAP1/2, et /ou TRAF2/3 qui sont d'importants régulateurs de NIK (Annunziata, Davis et al. 2007, Keats, Fonseca et al. 2007). L'activation aberrante de NF- $\kappa$ B est également détectée dans 60% des lymphomes de la zone marginale de la rate. Une analyse de ces cellules a révélé une perte de cIAP2 due à la présence de lésions génétiques dans son gène (Rossi, Deaglio et al. 2011).

Une étude récente a démontré qu'un traitement de cellules de glioblastome par un smac mimetic à des doses non toxiques entraînait une activation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B conduisant à l'élongation des cellules et à l'augmentation de leur capacité de migration et d'invasion, révélant de potentiels effets secondaires liés à la déplétion des IAP par un traitement aux smac mimetics (Tchoghandjian, Jennewein et al. 2013).



**Figure 7: Structure des membres de la famille E2F et de leurs co-activateurs.** Tous les E2F contiennent un domaine de liaison à l'ADN (DB : DNA Binding Domain). Les activateurs E2F1 à 3 possèdent un NLS (Nuclear Localisation Signal). Les facteurs E2F1 à 5 possèdent un domaine de transactivation (TD : Transactivation Domain) qui comprend des régions marquées box, nécessaires à l'activation de l'expression des gènes ainsi qu'un domaine de liaison avec les protéines de la famille Rb. Les répresseurs E2F4 et E2F5 possèdent un domaine NES (Nuclear Export Signal). E2F1 à 6 possèdent également un domaine de dimérisation (DIM) requis pour l'interaction avec les membres de la famille DP (Dimerization Partner).

## **V) Le facteur de transcription E2F1.**

Dans nos travaux, nous avons démontré que cIAP1 pouvait réguler le facteur de transcription E2F1. E2F1 est un facteur de transcription très important pour l'homéostasie cellulaire. C'est un important régulateur de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de la différenciation. Son rôle dans le cancer a largement été étudié.

### **A) Présentation de la famille des E2F.**

La fonction principale des facteurs de transcription E2F est l'activation ou la répression transcriptionnelle de gènes impliqués dans différents processus cellulaires : la prolifération, l'apoptose, la différenciation ou la réponse à des endommagements de l'ADN.

Le facteur de transcription E2F1 a été identifié en 1986 par deux équipes différentes par sa capacité à lier le promoteur de la protéine adénovirale E2 (Kovesdi, Reichel et al. 1986, La Thangue and Rigby 1987). Des travaux menés par l'équipe de Joe Nevins ont permis d'identifier le mécanisme d'activation de E2F1 par E1A. La protéine adénovirale E1A lie et séquestre un répresseur de E2F1, permettant ainsi son activation. Ce répresseur s'est avéré être la protéine Rb (Nevins 1992).

Chez les mammifères, la famille E2F comprend huit gènes (E2F1 à 8) codant 9 protéines distinctes, E2F3a et E2F3b étant issues d'un épissage alternatif (*Figure 7: Structure des membres de la famille E2F et de leurs co-activateurs*). Les membres de la famille E2F sont différenciés en fonction de leur activité transcriptionnelle, leur structure et leurs interactions avec les membres de la famille Rb : pRb, p107 et p130 (Trimarchi and Lees 2002) :

Les activateurs de la transcription, E2F1, E2F2 et E2F3a et b, interagissent majoritairement avec pRb. E2F3a et b, issus d'un épissage alternatif, ont des fonctions distinctes. Les répresseurs de la transcription sont E2F4 à 8 : E2F4 lie les trois membres de la famille Rb tandis que E2F5 s'associe préférentiellement avec p107 et p130. Leurs actions principales consistent à faciliter la sortie du cycle cellulaire et la différenciation terminale (Trimarchi and Lees 2002). La fonction majeure associée aux E2F6 à 8 est la répression de la transcription de façon indépendante des protéines de la famille Rb. E2F6 exerce son activité biologique en interagissant avec les membres du complexe polycomb (PcG), des facteurs chromatinien connus pour maintenir l'état transcriptionnel réprimé de leurs gènes cibles et impliqués dans la différenciation (DeGregori and Johnson 2006). Les membres E2F6 à 8 ne possèdent ni de domaine de transactivation ni de région liant les protéines Rb, c'est pourquoi elles exercent leur activité répressive indépendamment de Rb sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère.

Les co-activateurs DP (Dimerization Partner) lient les facteurs de transcription E2F1 à 6 qui contiennent des domaines de dimérisation et permettent leur recrutement sur l'ADN. E2F et DP contiennent eux le même domaine de liaison à l'ADN et reconnaissent la même séquence au niveau des promoteurs. Les protéines DP sont essentiellement régulées par phosphorylation au

même titre que les E2F. Le complexe Cycline A/Cdk2 (Cyclin dependent kinase 2) peut phosphoryler E2F1 et DP1 diminuant ainsi leur affinité pour l'ADN (Krek, Ewen et al. 1994).

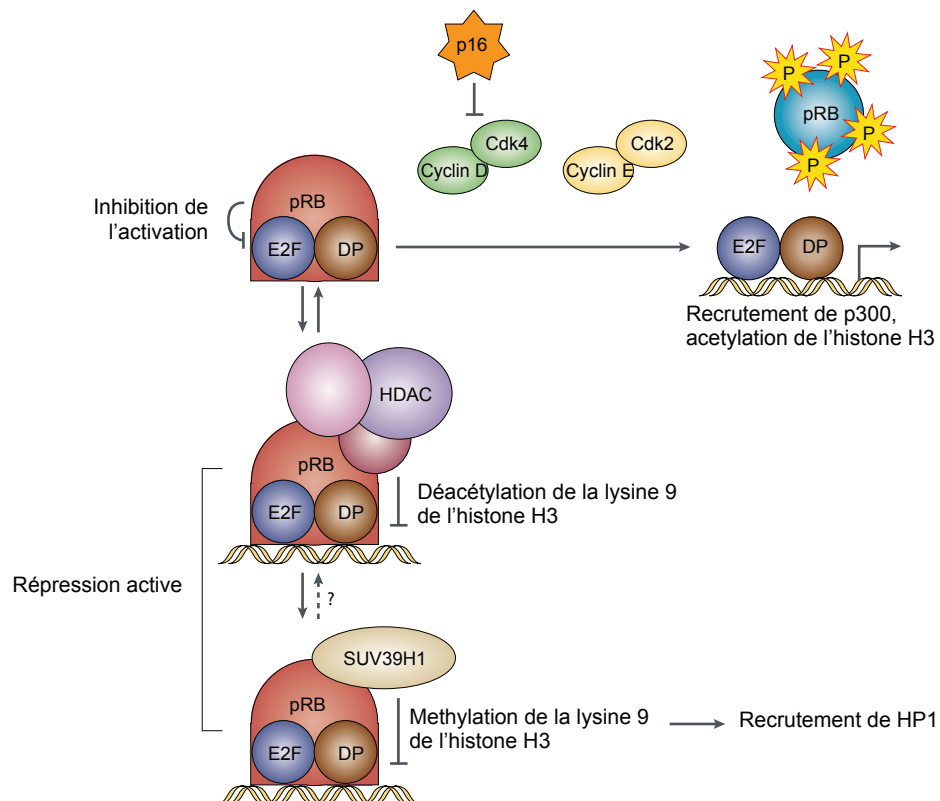
Cette classification a cependant été remise en question. En effet, des études utilisant des puces à ADN ont mis en évidence que les activateurs peuvent également se comporter en répresseurs (Polager and Ginsberg 2008, Chong, Wenzel et al. 2009). Les travaux menés dans l'équipe de Gustavo Leone vont dans ce sens. Dans les cellules souches embryonnaires ou intestinales, les E2F1 à 3 activent les gènes nécessaires à la prolifération cellulaire, tandis que dans les cellules différenciées localisées au niveau des villi intestinaux ou dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), ils sont associés à pRb et ont un rôle répresseur sur les promoteurs des gènes régulateurs de la prolifération (Chong, Wenzel et al. 2009).

### **B) Le rôle des E2F dans la régulation du cycle cellulaire et leur régulation.**

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont très importants pour la régulation du cycle cellulaire. Ils sont impliqués dans le contrôle de gènes codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Cyclines, Cdk), de la transcription de l'ADN (ADN polymérase), des points de contrôle du cycle (Chk1) et également les membres E2F eux-mêmes.

Ils sont activés de façon dépendante du cycle cellulaire et possèdent différents niveaux de régulations au cours du cycle. Ils sont régulés par les protéines à poche mais également par des modifications post-traductionnelles qui incluent des phosphorylations, acétylations, méthylations, ubiquitinations et neddylation (Polager and Ginsberg 2008).

Dans les cellules quiescentes, l'activité des membres activateurs E2F est réprimée par leur liaison à pRb. Sous forme déphosphorylée, la protéine pRb inhibe E2F1 en se fixant sur son domaine de transactivation, empêchant ainsi son interaction avec la machinerie de la transcription. En parallèle, les E2F répresseurs, E2F4/5 sont fixés sur les promoteurs des gènes cibles durant la phase G1 bloquant la transcription de ces gènes. Ils sont associés aux protéines à poche p107 et p130 et recrutent des HDAC (Histone désacétylase) qui déacétylent la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), facilitant la compaction de l'ADN. La HMTase (Histone Methyltransférase) Suv39H1 méthyle la même lysine. L'enchaînement de ces deux modifications aboutit à l'inhibition de la transcription. A la fin de la phase G1 du cycle cellulaire, Rb est phosphorylé par les complexes Cycline D/Cdk4 ou Cycline D/Cdk6 ce qui inhibe son interaction avec E2F. E2F ainsi libéré se lie à des séquences consensus situées au niveau des promoteurs de ses gènes cibles et induit leur transcription. E2F recrute la HAT (Histone Acetyl Transferase) p300 aboutissant à l'acétylation de H3K9. En même temps, la phosphorylation de p107 et p130 libère les E2F répresseurs, levant ainsi le blocage actif de la transcription et laissant la place à la fixation des E2F activateurs. La



**Figure 8: Régulation de l'activité des facteurs de transcription E2F.** Les protéines Rb lient et inhibent E2F1/DP en phase G0/G1 du cycle cellulaire, d'une part en empêchant son recrutement au niveau du promoteur, d'autre part en renforçant la répression active exercée par E2F4 et 5. Lorsqu'ils sont liés aux protéines à poche, les E2F répresseurs sont localisés sur le promoteur des cibles et recrutent des HDAC qui déacétylent H3K9. Ceci permet le recrutement de la HMTase SUV39H1 qui méthyle le même résidu afin de créer un site de fixation pour HP1 aboutissant à une inhibition de la transcription. L'entrée dans le cycle cellulaire dépend de la phosphorylation de Rb par les couples Cycline D/Cdk4/6 et Cycline E/Cdk2, libérant E2F1 qui peut alors se fixer sur son promoteur et recrute des HAT. Les E2F répresseurs sont libérés laissant ainsi les sites de fixation E2F accessibles au niveau du promoteur (D'après Trimarchi and Lees, 2002).

plupart des gènes transcrits codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ou dans la progression du cycle cellulaire telles que des ADN polymérases, des Cyclines, des Cdk, etc. La Cycline E peut ensuite se fixer à Cdk2 qui à son tour phosphoryle les protéines de la famille Rb, permettant la poursuite du cycle cellulaire (Cam and Dynlacht 2003).

En fin de phase de S, la Cycline A associée à Cdk2 induit la phosphorylation de E2F1/DP1 à son extrémité amino-terminale libérant l'hétérodimère E2F1/DP1 de l'ADN. Cette phosphorylation est suivie d'une ubiquitinylation par Skp2 qui induit la dégradation de E2F1 (Yam, Fung et al. 2002) (*Figure 8 : Régulation de l'activité des facteurs de transcription E2F*).

### **C) E2F1 dans la régulation de l'apoptose.**

IL existe deux mécanismes de régulation de l'apoptose par E2F1 dépendant ou indépendant de p53.

#### **1. Voie dépendante de p53**

E2F1 peut induire l'apoptose par la voie p14/p19ARF/MDM2/p53. p14/p19ARF sont des cibles transcriptionnelles de E2F1. Ce sont des inhibiteurs de MDM2 (Mouse Double Minute2), une E3 ubiquitine ligase adressant p53 au protéasome (Vousden and Lu 2002). Ainsi E2F1 peut contrôler le niveau d'expression de p53 et donc son activité apoptotique.

En réponse à des endommagements de l'ADN, E2F1 est stabilisé par la phosphorylation de sa sérine 31 par ATM/ATR (Lin, Lin et al. 2001) et sa sérine 364 par Chk2 (Stevens, Smith et al. 2003). En retour, E2F1 augmente l'expression d'ATM et Chk2 qui vont phosphoryler p53 et provoquer son accumulation (Berkovich and Ginsberg 2003).

Une fois activé, E2F1 augmentera également l'expression d'autres cibles impliquées dans les voies d'endommagements de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose telles que Chk1, la caspase-7, p73, APAF-1...

#### **2. Voies indépendantes de p53**

Parmi les gènes cibles de E2F1, de nombreux codent pour des protéines régulatrices de l'apoptose qui ne sont pas liées directement à p53. L'une des plus étudiées est la protéine p73, de la famille de p53. L'activation de p73 par E2F1 peut aboutir à la transcription de gènes pro-apoptotiques des cellules déficientes en p53. E2F1 active également l'expression d'APAF-1, facteur important de la voie intrinsèque de l'apoptose, différentes caspases comme la caspase-7 et des inhibiteurs des IAP comme SMAC/DIABLO (Putzer 2007). D'autres cibles incluent les protéines contenant un domaine BH3 isolé (protéines BH3-only) telles que PUMA, BIM, NOXA qui auront une fonction pro-apoptotique (Bracken, Ciro et al. 2004).



Au contraire, E2F1 bloque la transcription des gènes codants les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-2 ou MCL-1 ce qui favorise le déclenchement de l'apoptose (Polager and Ginsberg 2008). E2F1 peut également diminuer le niveau de transcrits de TRAF-2, impliqué dans la signalisation de NF- $\kappa$ B ce qui bloque la voie de survie NF- $\kappa$ B en réponse au TNF- $\alpha$  (Phillips, Ernst et al. 1999).

E2F1 contrôle également la protéine SC35, responsable de l'épissage alternatif de protéines pro-apoptotiques telles que c-FLIP, les caspases-8 et -9 et Bcl-x, favorisant ainsi les variants pro-apoptotiques de ces protéines (Merdzhanova, Edmond et al. 2008). E2F1 favorise ainsi l'activation de la caspase-8 après une stimulation des récepteurs de mort en favorisant la production du variant c-FLIPs (short FLIP) de la protéine c-FLIP (Salon, Eymin et al. 2006).

## VI) Le rôle de E2F1 dans le cancer

### A) Dérégulation de E2F1 dans les échantillons tumoraux

La protéine E2F1 est particulièrement intéressante à étudier, en effet, elle est importante d'une part pour la progression des cellules dans le cycle cellulaire, d'autre part pour l'induction de l'apoptose, notamment en réponse à des endommagements de l'ADN. Ces propriétés lui confèrent donc à la fois des caractéristiques oncogéniques et suppressives de tumeurs. Il n'est donc pas étonnant de voir son expression modifiée dans des échantillons tumoraux.

En 1995, une étude a montré que l'expression ectopique de E2F1, seule ou en coopération avec l'oncogène Ras, induit une transformation oncogénique *in vitro* (Xu, Livingston et al. 1995). Ceci a ensuite été confirmé *in vivo* dans le cancer du côlon (Kasahara, Takahashi et al. 2000). L'inactivation de E2F dans des souris hétérozygotes pour Rb provoque une diminution de la fréquence de tumeurs thyroïdiennes et hypophysaires (Yamasaki, Bronson et al. 1998). Ces propriétés oncogéniques de E2F1 peuvent être expliquées par son rôle très important dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération mais également de l'apoptose.

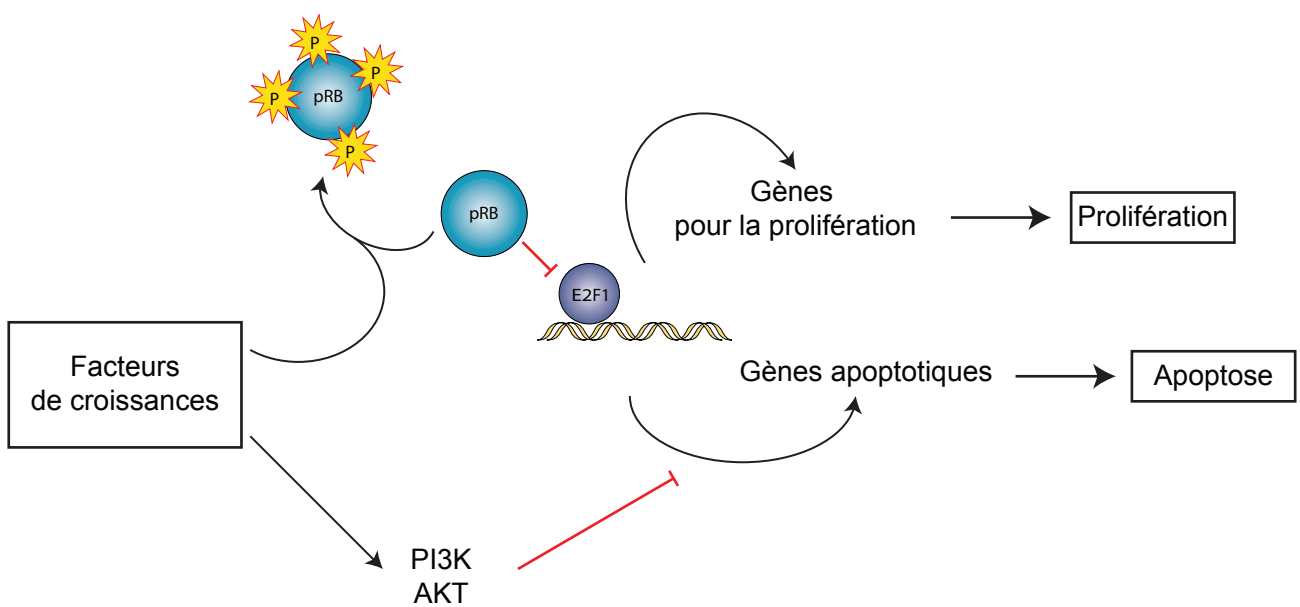
Une amplification du gène codant pour E2F1 a été identifiée dans des métastases ganglionnaires de mélanomes (Nelson, Reynolds et al. 2006) et une augmentation de l'expression de E2F1 est observée dans des carcinomes mammaire (Zacharatos, Kotsinas et al. 2004), œsophagiens (Ebihara, Miyamoto et al. 2004) ou dans des glioblastomes (Alonso, Fueyo et al. 2005). La surexpression de E2F1 est associée à un mauvais pronostic pour les patients souffrant de carcinomes œsophagiens (Alonso, Fueyo et al. 2005) et de tumeurs stromales gastro-pancréatique (Yamazaki, Yajima et al. 2003). De plus, l'activité du couple Rb/E2F est dérégulée dans de nombreux cancers dus à une délétion de Rb ou d'un de leurs régulateurs tels que p16INK, Cycline D1 ou Cdk4 (Sherr and McCormick 2002).

Cependant, l'expression de E2F1 peut être diminuée dans certains cancers (Zacharatos, Kotsinas et al. 2004), cette diminution est corrélée à un mauvais pronostic dans les adénocarcinomes coliques (Bramis, Zacharatos et al. 2004), dans les cancers de la vessie (Rabbani, Richon et al. 1999) ou les lymphomes B (Moller, Kania et al. 2000).

### B) E2F1 ou comment un suppresseur de tumeur participe à la progression tumorale.

#### 1. Le fragile équilibre entre prolifération et apoptose.

E2F1 a longtemps été considéré comme un important régulateur de l'apoptose en réponse à des endommagements de l'ADN dans tous les types de cancer humains (Engelmann and Putzer 2010). La plupart des tumeurs ont une inactivation de Rb, par conséquent, la perte de régulation



**Figure 9: Régulation de l'expression des cibles de l'apoptose ou de la prolifération de E2F1 par la voie PI3K/AKT.** La stimulation des cellules par des facteurs de croissance active de nombreuses voies de signalisations intracellulaires importantes pour le destin de la cellule. L'activation du couple Cycline D/Cdk4 va par exemple phosphoryler Rb supprimant sa répression sur E2F1 qui pourra activer la transcription de cibles importantes pour la prolifération et l'apoptose. L'activation parallèle de la voie PI3K/AKT bloquera la transcription des cibles apoptotiques et permettra à la cellule de se diviser normalement.

de E2F1 dans ce contexte est considérée comme un moyen de déclencher l'apoptose par la voie p53/p73.

Il se pose alors la question de la balance entre l'induction et l'inhibition de la tumorigénicité par E2F1. Cet effet dépend des signaux pro- et anti-apoptotiques reçus par la cellule. Il a été montré que les cellules tumorales ont souvent d'importants blocages dans les voies de signalisations régulées par E2F1 menant à la mort cellulaire (Soengas, Capodieci et al. 2001), ce qui signifie que dans les cellules sélectionnées, la dérégulation de E2F1 par la perte de Rb ne déclenche pas l'apoptose.

Dans les cellules normales qui prolifèrent, les fonctions apoptotiques de E2F1 sont réprimées par la voie PI3K/AKT (Hallstrom and Nevins 2003) activée par une stimulation sérique. Cette voie est très importante pour l'inhibition de l'apoptose par la phosphorylation de différentes protéines apoptotiques telles que BAD (Datta, Dudek et al. 1997), la caspase-9 (Cardone, Roy et al. 1998) et MDM2 (del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997). Mais cette inhibition ne s'explique pas seulement par des modifications post-traductionnelles des cibles pro-apoptotiques de E2F1. En effet, il a été montré qu'après stimulation sérique et activation de la voie PI3K/AKT, certaines cibles de E2F1 avaient une expression diminuée alors que l'expression des cibles classiques de la progression du cycle cellulaire était augmentée (Hallstrom, Mori et al. 2008) (*Figure 9: Régulation de l'expression des cibles de l'apoptose ou de la prolifération de E2F1 par la voie PI3K/AKT*). L'étude a ensuite révélé que ces nouvelles cibles de E2F1, comme AMPK $\alpha$ 2 (un senseur du niveau d'énergie cellulaire impliqué dans la voie PI3K) étaient importantes pour l'induction de l'apoptose. Une analyse de tumeurs mammaires ou ovariennes a révélé que les patients avec un niveau d'expression bas des cibles réprimées par PI3K et au contraire une expression élevée des cibles activées par cette voie avaient un mauvais pronostic en comparaison des patients présentant un profil d'expression inversé (Hallstrom, Mori et al. 2008).

De plus, E2F1 contrôle la voie PI3K/AKT en régulant la transcription de l'adaptateur protéique de la voie AKT, Gab2 (Grb2 associated binder 2) (Chaussepied and Ginsberg 2004) suggérant un autocontrôle de son activité apoptotique, en faveur d'un signal de survie indépendant de Rb.

## 2. E2F1 et la formation de métastases

Une étude menée en 2010 sur des cancers de la vessie a montré qu'une expression élevée de E2F1, associée à une expression élevée de ses gènes cibles, est un facteur de prédiction de l'invasivité des cellules tumorales (Lee, Leem et al. 2010). Cette étude a également mis en évidence un enrichissement en sites de fixations E2F dans les promoteurs des gènes associés à un phénotype invasif des cellules, suggérant l'existence d'un lien entre E2F1 et l'invasivité des cellules.

Dans un modèle de mélanome métastatique, une diminution d'expression de E2F1 diminue la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses sans affecter la prolifération cellulaire (Alla, Engelmann et al. 2010). De plus, la diminution d'expression de E2F1 diminue fortement la capacité de ces cellules à envahir les poumons des souris injectées, identifiant E2F1 comme un élément central régulant la capacité à métastaser des cellules de mélanome.

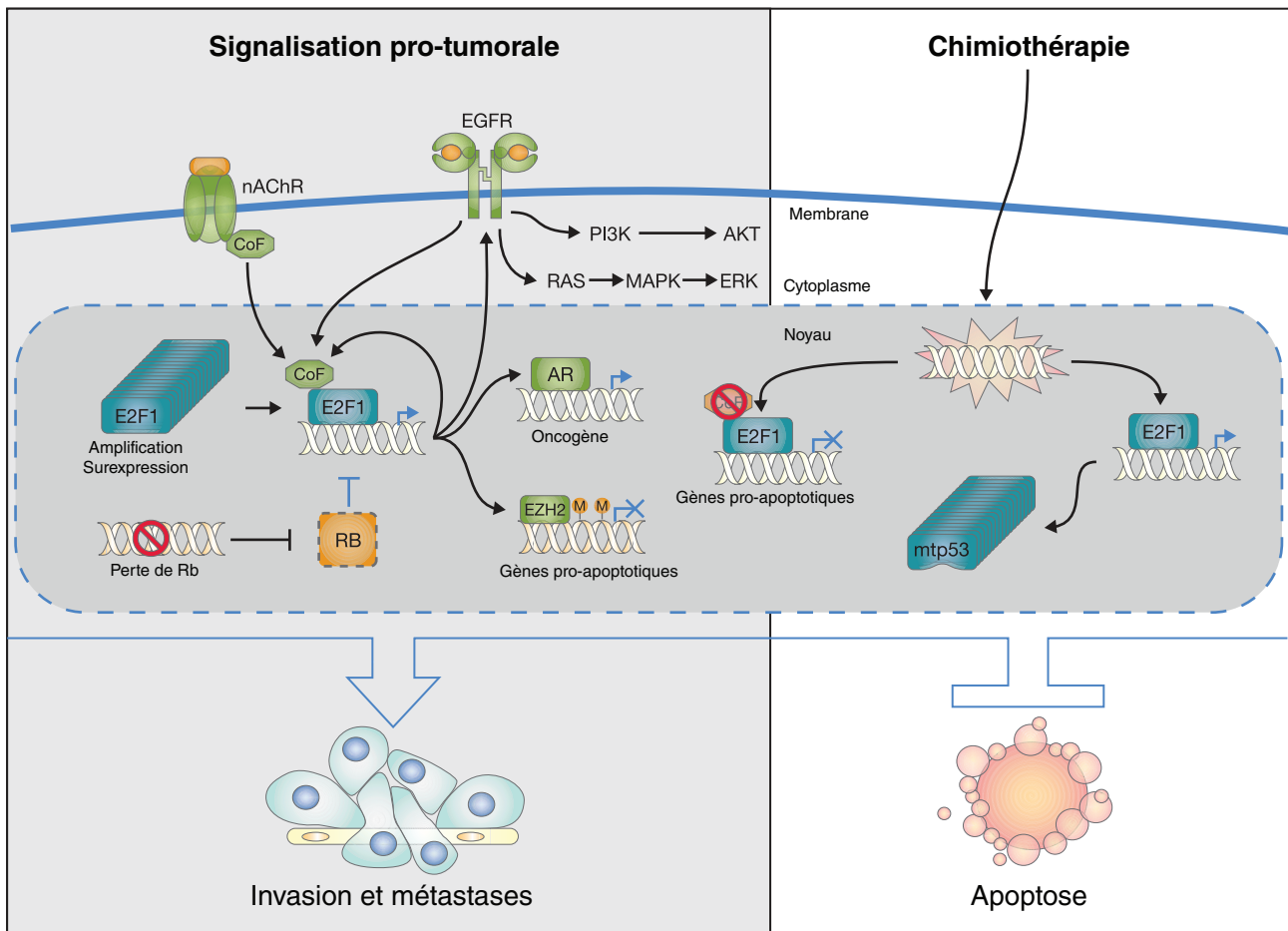
Cet effet sur l'invasivité des cellules passe par une surexpression de EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) et une activation des voies de signalisations MAPK/ERK et PI3K/AKT. De plus le ligand de l'EGFR, HBEGF, semble être une cible transcriptionnelle de E2F1 suggérant une stimulation autocrine des cellules (Alla, Engelmann et al. 2010).

Une autre étude a montré que le récepteur des androgènes, un facteur important pour l'initiation et la progression des cancers de la prostate, est sous contrôle de E2F1 dans les cellules de cancers ainsi que dans des modèles de xénogreffes. E2F1 est retrouvé sur le promoteur du gène du récepteur des androgènes et son recrutement est augmenté en l'absence de Rb (Sharma, Yeow et al. 2010). Une analyse des échantillons métastatiques de cancer de la prostate a montré que la perte de Rb corrélait avec un niveau élevé de E2F1 et du récepteur des androgènes.

Ces données révèlent que dans les cellules cancéreuses surexprimant E2F1, le EGFR ainsi que le récepteur des androgènes sont importants pour la formation de métastases. Il est alors imaginable que E2F1 régule d'autres récepteurs aux facteurs de croissance dans d'autres types de cancers.

Dans un modèle non cancéreux, la voie Rb/E2F est importante pour la migration des neurones durant le développement, indépendamment de la régulation du cycle cellulaire (Andrusiak, McClellan et al. 2011). La régulation de la motilité cellulaire par le couple Rb/E2F apparaît alors comme un phénomène physiologique important pour le développement qui est réactivé dans les cellules cancéreuses.

L'angiogénèse est essentielle pour la croissance de la tumeur primaire et la dissémination des métastases. Des sites de fixations de E2F ont été identifiés sur les promoteurs de gènes impliqués dans l'angiogénèse. Une déplétion de E2F1 empêche l'expression de ces gènes et inhibe la formation des tubules angiogéniques induites par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Pillai, Kovacs et al. 2010). Une étude récente a montré que E2F1 régule la signalisation VEGF-C/VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor-C/receptor-3) dans les cellules cancéreuses. L'activation ou la surexpression de E2F1 entraîne l'augmentation de l'expression du VEGFR-3 et de son ligand VEGF-C alors que la diminution de E2F1 réprime leur expression. Cet effet de E2F1 est fondamental dans les cellules cancéreuses pour la formation de tubes capillaires et la néo-vascularisation dans les souris. De plus, une boucle d'amplification a été identifiée : E2F1 et VEGFR-3 synergisent pour augmenter l'expression d'un autre facteur pro-angiogénique, PDGF-B (platelet-derived growth factor B) (Engelmann, Mayoli-Nussle et al. 2013) (*Figure 10: Comment E2F1 favorise la progression tumorale*).



**Figure 10: Comment E2F1 favorise la progression tumorale.** Dans les tumeurs qui ont perdu l'expression de Rb et qui surexpriment E2F1, l'expression des cibles oncogéniques de E2F1 est fortement augmentée, comme les récepteurs de facteurs de croissance (EGFR), les protéines du complexe Polycomb (EZH2) ainsi que des co-facteurs nucléaires (CoF). Ceci entraîne l'activation de voies de signalisations cytoplasmiques et nucléaires importantes pour l'invasivité des cellules. Une boucle d'amplification se met en place puisque E2F1 augmente l'expression de ses propres cofacteurs et amplifie ses propriétés oncogéniques en bloquant ses fonctions pro-apoptiques. Dans ces conditions, la chimiothérapie va augmenter l'expression d'oncogènes comme p53 muté (mtp53) et augmenter la résistance à l'apoptose. La perte d'expression des cofacteurs importants pour l'expression des cibles impliquées dans la mort cellulaire explique cette réponse anti-apoptotique (d'après Engelmann and Pützer., 2012).

### 3. L'importance des cofacteurs de E2F1 dans la progression tumorale

L'activité transcriptionnelle de E2F1 est fréquemment régulée par des cofacteurs nucléaires. Une première catégorie de ces co-facteurs agit en augmentant l'activité transcriptionnelle de E2F1. C'est le cas par exemple de ANCCA (AAA nuclear coregulator cancer-associated protein) (Revenko, Kalashnikova et al. 2010). ANCCA lie directement E2F1 et régule son activité. Une analyse d'échantillons de cancer du sein a permis d'associer un niveau élevé de ANCCA avec la présence de métastases ainsi qu'un faible taux de survie.

Un autre exemple est NCOA3/ACTR (nuclear receptor coactivator 3) qui est un important régulateur positif de l'activité de E2F1 jouant un rôle dans la tumorigénicité et la progression tumorale (Louie, Zou et al. 2004).

Il a également été montré dans un modèle de cancer mammaire que le EGFR nucléaire interagit avec E2F1 et active la transcription de B-Myb (un proto-oncogène impliqué dans le cycle cellulaire sous le contrôle transcriptionnel de E2F1) (Hanada, Lo et al. 2006). Il est intéressant de noter que E2F1 active la transcription de ces cofacteurs, suggérant une possible boucle d'amplification par E2F1 lui-même.

Une régulation de E2F1 après stimulation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) a également été mise en évidence. Après stimulation de nAChR par la nicotine, ARRB1 (Arrestin beta 1) est exportée dans le noyau des cellules de cancer du poumon où elle s'associe avec E2F1 (Dasgupta, Rizwani et al. 2011). La protéine ARRB1 est importante pour la progression des cancers ovariens, notamment pour l'invasivité et la formation de métastases (Rosano, Cianfrocca et al. 2009) (*Figure 10*).

La première indication qu'un cofacteur négatif de E2F1 est important pour la progression tumorale vient d'une étude menée en 2010 (Docquier, Harmand et al. 2010). La protéine RIP140 (receptor-interacting protein of 140 kDa) lie le domaine d'interaction avec Rb de E2F1 et mime l'activité de Rb. Un niveau d'expression bas de RIP140 est associé avec une expression forte des cibles de E2F1 dans un modèle de cancer mammaire qui forme fréquemment des métastases et possède un faible taux de survie.

### 4. E2F1 et la résistance au traitement

De par sa capacité à induire l'apoptose en réponse à des endommagements de l'ADN, E2F1 a longtemps été considéré comme un allié dans le traitement des cancers. Un suivi de patients atteints de cancer du sein a démontré que les patients exprimant E2F1 présentaient moins de rechutes et de métastases (Kwon, Nam et al. 2010) ce qui est en accord avec une étude clinique qui associe l'expression de E2F1 avec une augmentation de la survie des patients souffrant

d'adénocarcinomes gastriques traités par chimiothérapie post-opératoire, identifiant E2F1 comme un facteur prédictif d'efficacité thérapeutique (Lee, Park et al. 2008).

Mais cette vision concernant l'expression de E2F1 a été contrecarrée par des études montrant que la surexpression ou l'amplification de E2F1 concomitamment à une perte de Rb, un phénomène fréquemment retrouvé dans les cancers, est associée au développement de métastases (Imai, Oda et al. 2004, Sharma, Yeow et al. 2010) et à la résistance à la chimiothérapie (Han, Park et al. 2003).

Il semble donc que dans un certain contexte, E2F1 joue un rôle opposé à son rôle physiologique, il ne déclenche pas l'apoptose en réponse à un endommagement de l'ADN, mais au contraire protège les cellules cancéreuses de la mort induite par chimiothérapie.

C'est encore par le jeu de cofacteurs transcriptionnels de E2F1 que s'installe la résistance aux traitements. La protéine MCPH1 (microcéphaline 1) coopère avec E2F1 pour l'induction de gènes responsables de la réparation de l'ADN et l'apoptose en réponse à un endommagement de l'ADN dans des cellules normales et cancéreuses (Yang, Lin et al. 2008). Une étude a révélé que des niveaux d'expression bas de MCPH1 sont associés à une instabilité génomique et à la formation de métastases (Rai, Dai et al. 2006). De plus, la protéine EZH2 qui bloque la transcription dépendante de E2F1 de la cible pro-apoptotique BIM bloque le déclenchement de l'apoptose en réponse à des endommagements de l'ADN (Wu, Lee et al. 2011), EZH2 étant elle-même une cible de E2F1, induite en réponse à des endommagements de l'ADN, dans ce contexte, la chimiothérapie peut accentuer l'échappement à l'apoptose des cellules.

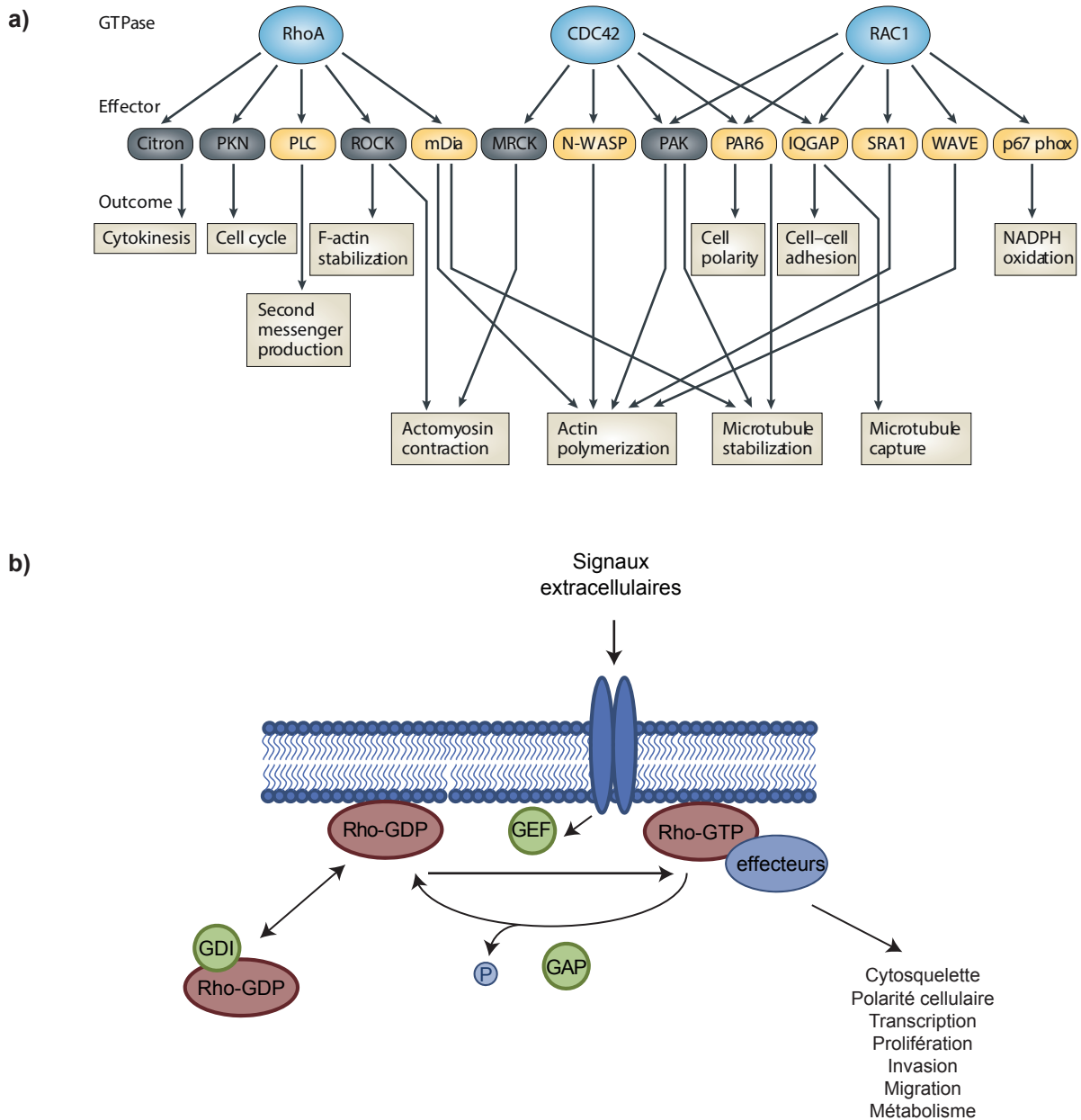
Une autre observation dans ce sens est la nécessité de E2F1 pour induire l'expression de mutant de p53 en réponse à un traitement endommageant l'ADN (Bug and Dobbstein 2011). L'accumulation de mutant de p53 entraîne une augmentation de la résistance aux traitements ainsi qu'une augmentation de la formation de métastases (Muller, Caswell et al. 2009).

En réponse à des endommagements de l'ADN, E2F1 subit des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, la neddylation et l'ubiquitination, modulant ainsi la stabilité de la protéine (Putzer and Engelmann 2013). Des études ont montré que dans les cellules cancéreuses, il y avait dérégulation de ces modifications ce qui, en association avec les cofacteurs de E2F1, limite l'induction de l'apoptose. L'expression des gènes conduisant à l'apoptose est bloquée alors que la transcription de gènes de survie n'est pas affectée (Putzer and Engelmann 2013).

De plus, la perte de Rb dans les cancers avancés est également importante pour la résistance aux traitements puisqu'il a été montré que Rb-phosphorylé en association avec E2F1 pouvait stimuler la transcription de gènes pro-apoptotiques (Ianari, Natale et al. 2009, Carnevale, Palander et al. 2012).



Tous ces mécanismes permettent de comprendre l'existence de tumeur avec un fort niveau d'expression de E2F1 et une absence d'apoptose, ce qui diminue l'efficacité des traitements (*Figure 10*).



**Figure 11: Les effecteurs et fonctions cellulaires régulés par les RhoGTPases et leur cycle d'activation.** **(a)** Présentation des principaux effecteurs de RhoA, cdc42 et Rac1 ainsi que les fonctions cellulaires qu'ils régulent. Les effecteurs présentés en gris possèdent une activité kinase. (Iden and Collard, 2008). **(b)** En réponse à divers stimuli, les GEFs catalysent la dissociation du GDP et la fixation du GTP sur les Rho. Rho-GTP interagit ensuite avec ses effecteurs, permettant la transmission du signal régulant divers processus cellulaires. Les GAPs augmentent l'activité GTPasique intrinsèque des Rho et donc l'hydrolyse du GTP en GDP. Les RhoGDIs séquestrent Rho-GDP dans le cytosol. (D'après Stengel et al., 2011)

## **VII) Cdc42, un membre de la famille des RhoGTPases.**

Dans la seconde partie de mon travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de cIAP1 sur cdc42. Cdc42 appartient à la famille des RhoGTPases, il est un important régulateur du remaniement du réseau d'actine. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons à son rôle oncogénique après avoir introduit la famille des RhoGTPases et les mécanismes cellulaires régulés par cdc42.

### **A) Les RhoGTPases.**

Cdc42 est membre de la famille des RhoGTPases appartenant à la superfamille Ras de petites GTPases. Les RhoGTPases sont importantes pour la régulation de la réorganisation du cytosquelette d'actine avec une incidence sur la prolifération, la motilité, l'adhésion, la migration et la polarisation cellulaire ainsi que sur les mouvements vésiculaires et membranaires intracellulaires. Les RhoGTPases sont des protéines à activité GTPasique de faible poids moléculaire (entre 20 et 30 kDa), très conservées au cours de l'évolution. Chez l'homme, il en existe une vingtaine bien que les plus étudiées soient RhoA, Rac1 et cdc42. Les RhoGTPases fonctionnent comme des « interrupteurs » moléculaires, oscillant entre un état inactif lié au GDP et un état activé lié au GTP (Sinha and Yang 2008) qui permet l'interaction des RhoGTPases avec des effecteurs responsables de la réponse biologique (Stengel and Zheng 2011).

Selon leurs effecteurs, les RhoGTPases régulent des fonctions cellulaires différentes. Ceci est résumé dans la *Figure 11 : Les effecteurs et fonctions cellulaires régulés par les RhoGTPases et leur cycle d'activation, a.* On observe alors que cdc42 et Rac1 ont des effecteurs en commun et que les RhoGTPases peuvent réguler des processus cellulaires identiques par l'intermédiaire d'effecteurs différents.

L'état d'activation des protéines Rho est finement régulé, il est induit par divers stimuli intrinsèques à la cellule ou à une stimulation par de nombreux types de récepteurs (récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), récepteurs tyrosines kinases (RTKs), récepteurs aux cytokines ou intégrines).

### **B) Le cycle d'activation des RhoGTPases.**

Ce cycle d'activation est un processus très finement régulé mettant en jeux différents acteurs moléculaires (*Figure 11b*).

#### **1. Les Facteurs d'échanges : GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor).**

A la suite d'une stimulation, les RhoGTPases sont activées par des facteurs d'échanges nucléotidiques (GEF) (Rossman, Der et al. 2005). Les GEF se fixent sur Rho-GDP et permettent l'exclusion du GDP, un GTP peut alors se fixer sur la protéine Rho, changeant sa conformation et permettant son interaction avec ses effecteurs. Il existe plus de soixante-dix GEFs différentes, ces

dernières sont à la fois spécifiques de la RhoGTPase qu'elles activent mais aussi du signal en amont.

## 2. Les Activateurs de GTPase : GAP (GTPase-Activating Protein).

Les activateurs de GTPases ou GAP permettent le passage d'une forme active d'une Rho à sa forme inactive. La fixation d'une GAP augmente l'activité GTPasique intrinsèque des Rho catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP (Tcherkezian and Lamarche-Vane 2007). Chez l'homme, les GAP sont au nombre de quatre-vingt et sont spécifiques des RhoGTPases ainsi que du type cellulaire. Cette famille de protéine est caractérisée par la présence d'un domaine RhoGAP, liant spécifiquement les RhoGTPases sous leurs formes actives, c'est-à-dire liées au GTP. Ces protéines possèdent aussi souvent des domaines SH3 qui leur permettent de prendre part à des complexes protéiques.

## 3. Les RhoGDI.

Les RhoGDI, contrairement aux GEF et GAP interagissent avec les deux formes active et inactive des Rho (Hoffman, Nassar et al. 2000). Ils possèdent une poche hydrophobe de liaison aux groupements prenyles qui favorise le détachement des Rho des membranes et les solubilise au niveau cytosolique. Les RhoGDI jouent plusieurs rôles dans le cycle d'activation des RhoGTPases (Garcia-Mata, Boulter et al. 2011) :

- Ils séquestrent et stabilisent leur forme inactive Rho-GDP en collaboration avec les protéines de choc thermique HSP (Heat Shock Protein) 70 et 90, maintenant 90 à 95% des RhoGTPases dans leur forme Rho-GDP dans le cytoplasme. Ce « pool » de Rho-GDP est donc activable en cas de stimuli (Garcia-Mata, Boulter et al. 2011).
- Les RhoGDI permettent également la navette des RhoGTPases entre le cytosol, le reticulum endoplasmique et le site d'activation souvent membranaire.

Il existe seulement trois RhoGDI différents, capables de lier différents RhoGTPases :

- RhoGDI $\alpha$ , forme ubiquitaire présentant une forte affinité pour RhoA, RhoC, Rac1, Rac2 et Cdc42.
- RhoGDI $\beta$  présent essentiellement dans les cellules hématopoïétiques et présentant une faible affinité vis à vis des RhoGTPases.
- RhoGDI $\gamma$  localisé au sein de l'appareil de Golgi interagit préférentiellement avec RhoB et RhoG.

Les RhoGTPases entrent en compétition pour leur liaison à RhoGDI, ce qui participe aux mécanismes de régulation croisée des membres de la famille RhoGTPases.

### **VIII) Les processus biologiques régulés par cdc42 et leur importance dans le développement tumoral.**

Aucune mutation de cdc42 n'a été détectée dans des échantillons tumoraux, cependant, cdc42 est surexprimé dans différents types de cancers : cancer du poumon non à petites cellules (Gomez Del Pulgar, Valdes-Mora et al. 2008), adénocarcinomes colorectaux (Gomez Del Pulgar, Valdes-Mora et al. 2008), mélanomes (Tucci, Lucarini et al. 2007), cancer du sein (Fritz, Just et al. 1999, Fritz, Brachetti et al. 2002) et cancer des testicules (Kamai, Yamanishi et al. 2004). Il a été démontré dans une étude portant sur le mélanome qu'une expression élevée de cdc42 corrélait avec un mauvais pronostic (Tucci, Lucarini et al. 2007). Ces études indiquent un rôle important de cdc42 dans le développement de cancer cependant les mécanismes impliqués sont toujours en cours d'analyse.

Cdc42 est important pour la prolifération cellulaire. Il a été montré qu'il est nécessaire à la transition G1-S ainsi que pour la mitose (Olson, Ashworth et al. 1995, Gjoerup, Lukas et al. 1998, Yasuda, Taniguchi et al. 2006). Il a été notamment démontré que cdc42 pouvait stimuler l'activité des facteurs E2F en stimulant la phosphorylation de Rb dans les fibroblastes NIH3T3 (Gjoerup, Lukas et al. 1998).

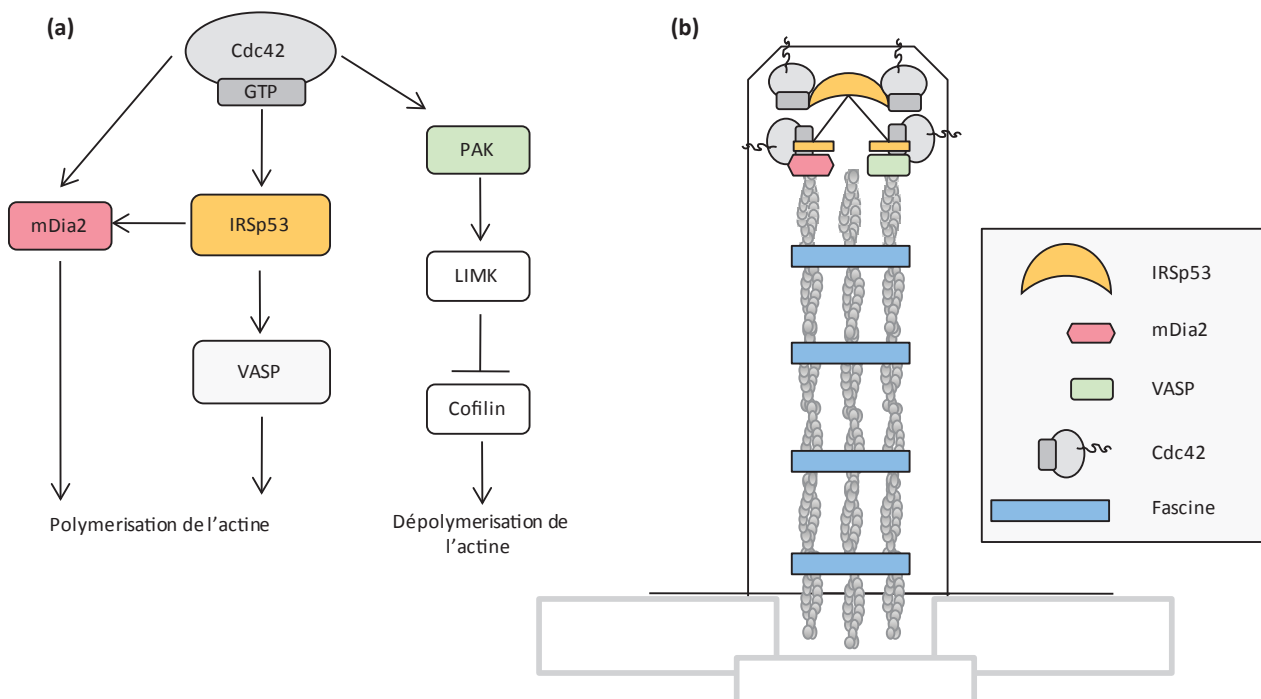
Cdc42 a également été impliqué dans la survie des cellules cancéreuses et dans la régulation de facteurs de transcriptions tels que SRF (Hill, Wynne et al. 1995), STAT3 (Debidia, Wang et al. 2005) et NF- $\kappa$ B via la régulation de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  (Perona, Montaner et al. 1997).

#### **A) Cdc42 et la formation de filipodes**

Dans les années 90, des études consistant en la micro-injection de RhoA, Rac1 et cdc42 dans des fibroblastes 3T3 ont permis d'identifier une réorganisation du cytosquelette spécifique de chaque Rho (Ridley and Hall 1992, Hall 1998) :

- RhoA régule la formation de fibres de stress. Les fibres de stress sont de longues fibres ancrées au niveau des sites d'adhésions focales formées de filament d'actine, pouvant se contracter et exercer des tensions.
- Rac1 régule la formation de lamellipodes. Ce sont de fines extensions cytoplasmiques formées en réponse à des facteurs de croissance, des cytokines ou des récepteurs d'adhésion. Les lamellipodes sont formés de façon très transitoire par un réseau d'actine branchée.
- Cdc42 régule la formation de filipodes. (*Figure 12: cdc42 dans la formation de filipodes*)

Les filipodes sont de fines protrusions membranaires, riches en actine, ressemblant à des «antennes» qui permettent à la cellule de sonder son environnement. Ils sont impliqués dans la migration (Vignjevic, Kojima et al. 2006), la chimiotaxie, la phagocytose ou la croissance axonale



**Figure 12: Cdc42 dans la formation de filopodes.** (a) Cdc42 est capable d'activer mDia2 et VASP via IRSp53 qui vont induire la polymérisation de l'actine. (b) L'interaction de Cdc42 avec IRSp53 au niveau membranaire induit une modification conformationnelle de la protéine. Cela permet le recrutement de mDia2 et VASP et provoque la polymérisation d'actine. Le réseau de filaments d'actine est renforcé par l'action de la fascin.

(Koleske 2003). Les filipodes peuvent émerger d'un réseau d'actine branchée présent dans un lamellipode ou bien ils peuvent se mettre en place en réponse à des stimuli comme des facteurs de croissance (EGF : Epidermal Growth Factor) ou des cytokines (TNF- $\alpha$ ). Les filipodes comme les lamellipodes sont formés de façon extrêmement transitoire (Ahmed, Goh et al. 2010).

Afin de déclencher la formation de filipodes, cdc42 active IRSp53 (Insulin Receptor Phosphotyrosine 53kDa substrate) qui va concentrer le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) (Suetsugu, Murayama et al. 2006), permettant le recrutement des protéines WASP, mDia2 et VASP qui participent à la construction du filipode :

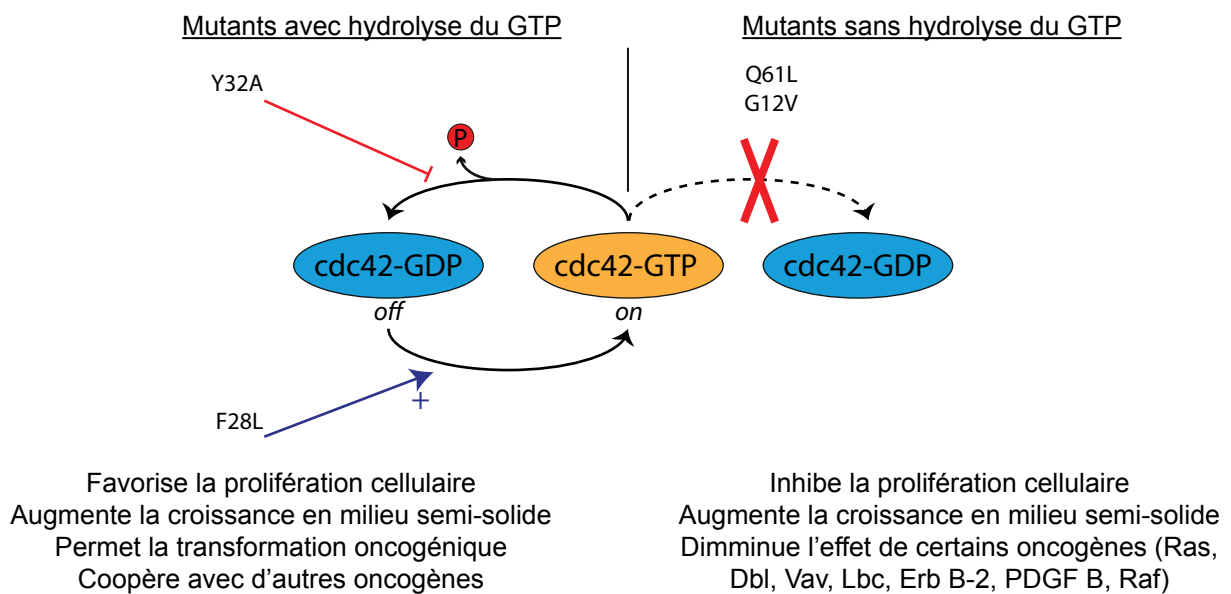
- WASP permet l'activation des nucléateurs d'actine ARP2/3. Ce processus a longtemps été décrit comme responsable de la formation de filipodes. Cependant l'observation de filipodes normaux dans les cellules dépourvues de WASP est venue contredire ce dogme (Snapper, Takeshima et al. 2001).
- VASP (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein) contribue à l'élongation des filaments d'actine présents dans le filipode. Elles se fixent sur leur extrémité et y ajoutent des monomères d'actine (Breitsprecher, Kieseewetter et al. 2011).
- mDia2 est un nucléateur d'actine qui permet sa polymérisation (Vignjevic, Kojima et al. 2006)

La Fascine est présente tout au long des filaments d'actine qui forment les filipodes. Elle permet de les lier les uns aux autres et de stabiliser la structure (Vignjevic, Kojima et al. 2006).

En accord avec l'hypothèse d'un rôle central de cdc42 dans la formation de filipodes, les cellules souches embryonnaires (ES) (Chen, Ma et al. 2000), les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Yang, Wang et al. 2006) ou encore les neurones (Garvalov, Flynn et al. 2007) cdc42<sup>-/-</sup> ne possèdent pas ou peu de filipodes. Cependant des cellules fibroblastoides dérivées de cellules souches embryonnaires cdc42<sup>-/-</sup> sont capables de générer des filipodes de façon normale. Le mécanisme de formation de filipodes indépendamment de cdc42 doit probablement se faire par l'intermédiaire de RhoF/Rif, l'unique RhoGTPase (avec cdc42) capable d'induire des filipodes (Pellegrin and Mellor 2005).

## **B) Cdc42 dans la polarisation cellulaire**

La polarisation cellulaire est cruciale dans développement d'organismes multi-cellulaires, elle détermine la morphologie des cellules, l'organisation des tissus et régule aussi la migration cellulaire. Un complexe, formé par cdc42, PAR3 et 6 (Partitioning defective) et la protéine kinase atypique aPKC, est essentiel dans la mise en place de la polarité cellulaire dans différents contextes (Etienne-Manneville and Hall 2001). Il régule la polarisation de la division asymétrique chez la levure et la drosophile, la polarisation apico-basale des cellules épithéliales, la croissance axonale, la mise en place de la synapse immunologique entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigènes et aussi la migration de fibroblastes en réponse à un gradient



**Figure 13: Les mutants de cdc42.** Les mutations activatrices de cdc42 stabilisent la forme cdc42-GTP. Parmi ces mutations, on distingue deux groupes selon la conservation de l'activité GTPasique de cdc42. Lorsque la fonction GTPasique est conservée, il est alors possible de ralentir le passage du GTP au GDP (Y32A) ou d'accélérer le passage du GDP au GTP (F28L). Seules les mutations conservant l'hydrolyse du GTP ont un fort pouvoir transformant, indiquant que plus que son état d'activation, c'est le cycle entre cdc42-GTP / cdc42-GDP qui est important pour la transformation oncogénique.



chimiotactique ou à une lésion (Iden and Collard 2008). Ce complexe est relocalisé, par l'intermédiaire de vésicules (Osmani, Peglion et al. 2010) et du facteur d'échange  $\beta$ PIX (Osmani, Vitale et al. 2006), à l'extrémité avant des cellules en migration, et il stimule la phosphorylation de GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ). Ce signal provoque la re-localisation d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) qui s'associe au centre d'organisation des microtubules (MTOC) et repositionne l'appareil de Golgi, le centrosome et le noyau en direction du front de migration (Etienne-Manneville and Hall 2003, Etienne-Manneville, Manneville et al. 2005).

### **C) L'activation de cdc42 dans la transformation oncogénique**

Les mutants constitutivement actifs de cdc42 favorisent la forme cdc42-GTP de la protéine soit en bloquant l'hydrolyse du GTP en GDP (mutants Q61L, G12V) soit en conservant l'hydrolyse du GTP mais en accélérant l'échange du GTP par le GDP (F28L) ou encore en ralentissant l'échange du GTP par le GDP (Y32A) (*Figure 13 : Les mutants cdc42*).

Il est intéressant de noter que les mutants, incapables d'hydrolyser le GTP, augmentent la croissance de cellules NIH3T3 en milieu semi solide mais réduisent la prolifération cellulaire, sont aussi incapables de transformer les cellules et peuvent même contrecarrer l'action d'autres oncogènes tels que Ras. Quant à eux, les mutants conservant une activité GTPasique, fonctionnent comme des oncogènes en stimulant la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la transformation oncogénique et peuvent coopérer avec d'autres oncogènes.

Ces résultats démontrent que, plus que la présence de la forme active de cdc42, c'est le cycle entre forme active et inactive qui est important pour ses fonctions oncogéniques. Aucune mutation activatrice de cdc42 n'a été identifiée dans les échantillons tumoraux, ce qui laisse supposer que l'activation de cdc42 est importante seulement à certains stades pour les cellules tumorales (Lin, Bagrodia et al. 1997, Vanni, Ottaviano et al. 2005, Fidyk, Wang et al. 2006).

### **D) Modification de la régulation de cdc42 dans le cancer**

Etant donné que le cycle d'activation de cdc42 est plus important que son activation dans le cancer, il est normal que des modifications de la régulation de ce cycle aient été identifiées dans différents cancers. Comme développé précédemment, il existe trois groupes de protéines influençant ce cycle : les GEF, les GAP et les RhoGDI.

#### **1. Dérégulation de GEF dans le cancer**

Des études dans les fibroblastes NIH3T3 ont montré que le pouvoir transformant de la protéine oncogénique Dbl était dû à une activation dérégulée des RhoGTPases dont cdc42 (Lin, Cerione et al. 1999).

Une autre étude implique cette fois Asef2, une GEF spécifique de cdc42 qui se fixe à APC. La fixation de APC sur Asef2 permet de libérer son extrémité C-terminal nécessaire à l'activation de cdc42 (Hamann, Lubking et al. 2007). Une surexpression de Asef2 ou une mutation de son site

d'interaction avec APC, des modifications fréquemment rencontrées dans les cancers colorectaux, entraîne une activation anormale de cdc42 (Kawasaki, Sagara et al. 2007).

Dans le modèle de souris APC<sup>-/+</sup> hétérozygotes pour un mutant de APC engendrant l'apparition spontanée d'adénomes intestinaux, il a été montré qu'une inhibition de Asef2 entraînait une diminution de la taille et du nombre d'adénomes (Kawasaki, Tsuji et al. 2009).

## **2. Dérégulation de GAP dans le cancer**

Les GAPs sont des régulateurs négatifs de cdc42 en augmentant son activité GTPasique. La protéine DLC-1, une GAP spécifique de RhoA et cdc42 est sous exprimée ou absente dans de nombreux types de cancers tels que les cancers du sein, des poumons, du colon, des ovaires, de l'utérus, des reins, du pancréas, de la prostate, et les carcinomes hépatocellulaires. De plus un niveau abaissé de la protéine a été observé dans des échantillons de cancer de la prostate en comparaison à des tissus sains (Durkin, Yuan et al. 2007).

## **3. Dérégulation de RhoGDI dans le cancer**

Les RhoGDIs, comme les GAP sont des inhibiteurs des RhoGTPases, ils inhibent la dissociation du GDP, séquestrent un pool de Rho dans le cytoplasme et régulent leur localisation à la membrane cytoplasmique.

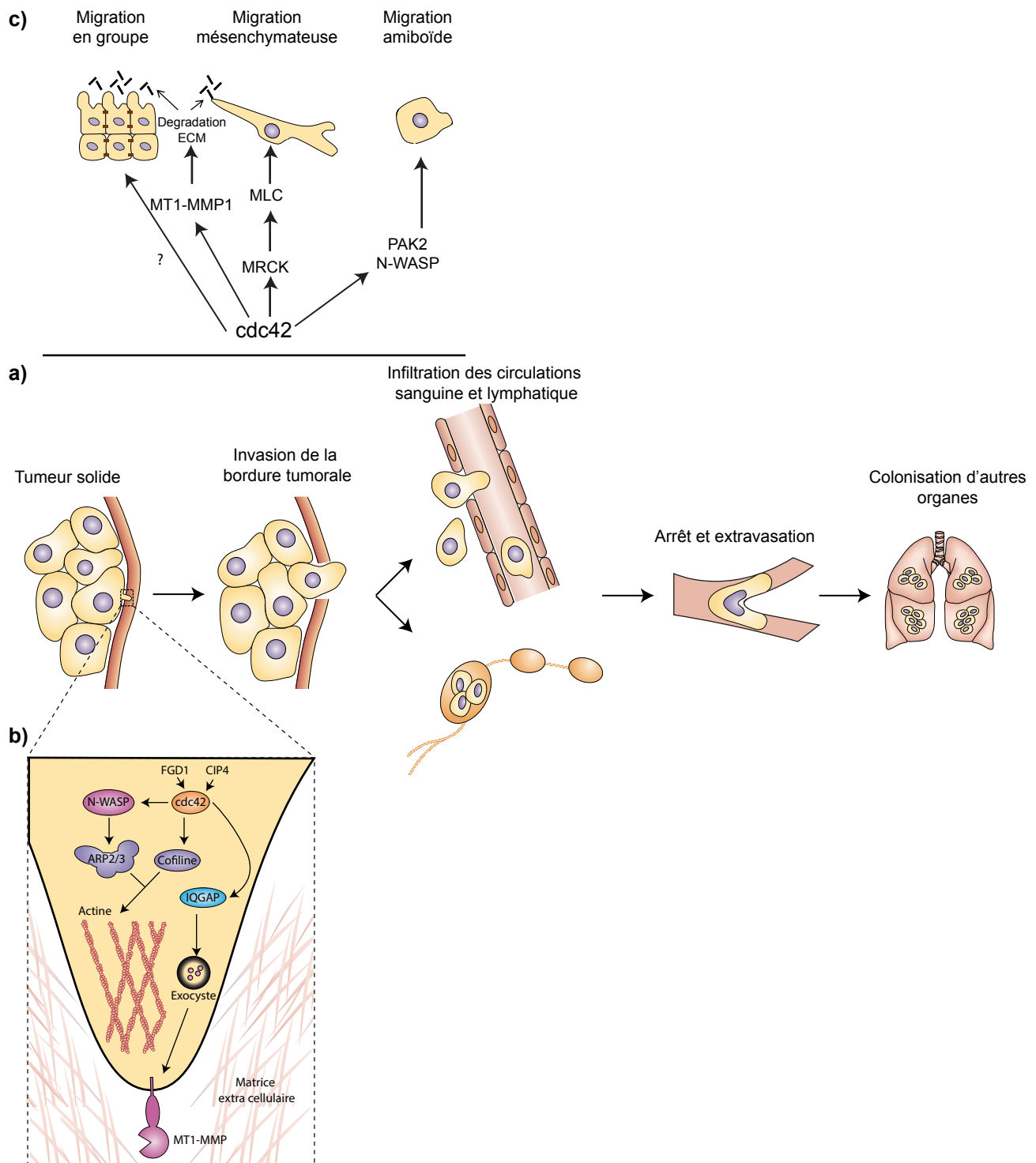
Le rôle des RhoGDI dans le cancer n'est pas clair, une étude a montré que l'expression de RhoGDI était diminuée dans les carcinomes hépatocellulaires et que ceci corrèle avec une activation des RhoGTPases et un phénotype invasif du cancer (Ding, Huang et al. 2010) mais d'autres études ont montrées un même phénotype avec une expression élevée de RhoGDI (Koide, Yamada et al. 2006, Harding and Theodorescu 2010).

Ceci reflète des différences tissulaires importantes ainsi que la complexité de la régulation de l'activité de cdc42 et des RhoGTPases en général dans le cancer.

## **E) Cdc42 dans la formation de métastases.**

Pour avoir formation de métastases, les cellules cancéreuses doivent se détacher de la tumeur primaire, migrer depuis le site tumoral à travers les tissus entourant la tumeur, passer au travers de l'endothélium vasculaire afin de s'intravaser dans les circulations sanguines et lymphatiques, survivre, s'extravaser dans des tissus sains et initier un nouveau site tumoral (Steeg 2003) (*Figure 14 : cdc42 et la formation de métastases*). Le contrôle du cytosquelette d'actine des cellules est donc fondamental dans ce processus afin de mettre en place les structures nécessaires à la migration et à l'adhésion des cellules.

Plusieurs études ont montré l'implication de cdc42 dans différentes étapes de ce processus et notamment dans des modèles de cancers humains (Bouzahzah, Albanese et al. 2001, Kamai, Yamanishi et al. 2004, Chen, Chan et al. 2010).



**Figure 14: cdc42 et la formation de métastases.** **(a)** Les différentes étapes clés de la formation de métastases. Les cellules cancéreuses quittent le site tumoral primaire, pénètrent les circulations sanguine et lymphatique et forment de nouveaux sites tumoraux dans des tissus sains (Steeg., 2003). **(b)** cdc42 est important pour la formation d'invadopodes en contrôlant la polymérisation du réseau d'actine via la régulation de N-WASP et de la Cofiline. Il est également important pour la digestion de la matrix extracellulaire grâce à l'adressage de MT1-MMP dans les invadopodes par la régulation de IQGAP (Murphy et al., 2011). **(c)** cdc42 est également important pour la migration des cellules, en régulant différents effecteurs, il joue un rôle dans la migration de groupe et également dans les migrations mésenchymateuse et amoiboïde (Stengel et al., 2011)

## 1. Formation d'invadopodes et activation des MMP.

Très proches des filipodes qui ont été caractérisés dans des modèles de migration en 2D, les invadopodes, décrits dans des modèles de migration en 3D sont aussi contrôlés par cdc42. Les cellules projettent des extensions cytoplasmiques riches en actine (les invadopodes) capables de dégrader la matrix extracellulaire (MEC) (Ayala, Baldassarre et al. 2006). Les cellules cancéreuses doivent dégrader la MEC afin de traverser la lame basale et d'aller envahir le tissu avoisinant. La digestion de la MEC se fait par l'action des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont des peptidases capables de digérer ses composants. Les invadopodes permettent à la cellule cancéreuse de concentrer la sécrétion de métalloprotéinases matricielles telles que MT1-MMP, MMP2 et MMP9 (Weaver 2006, Poincloux, Lizarraga et al. 2009) en un point précis permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration des cellules à travers les tissus.

In vitro, les invadopodes sont mis en évidence par la colocalisation de la dégradation d'une matrix fluorescente et d'un marquage de l'actine (Chen 1989). In vivo, les invadopodes sont importants pour l'intravasation et l'extravasation des cellules (Yamaguchi, Lorenz et al. 2005).

Dans des cellules d'adénocarcinome de rat, il a été montré que l'activation de cdc42 était nécessaire après une stimulation à l'EGF pour la formation d'invadopodes (Yamaguchi, Lorenz et al. 2005). L'activation de cdc42 entraîne l'activation de N-WASP et Arp2/3 nécessaire à la polymérisation d'actine formant des protrusions dans la matrix extracellulaire. Pour la formation de telles structures d'actine, une autre protéine est nécessaire, la cofiline, également contrôlée par cdc42.

Dans les cellules MDA-MB-231 qui forment beaucoup d'invadopodes, cdc42 a été montré comme important pour cette activité, en effet cette formation accrue d'invadopodes est médiée par CIP4 qui interagit avec cdc42 et entraîne l'activation de N-WASP (Pichot, Arvanitis et al. 2010). La GEF spécifique de cdc42, FGD1, active la formation d'invadopodes régulée par cdc42 dans des cellules de cancers du sein et de la prostate. Une diminution de son expression entraîne une diminution de dégradation de la matrix extracellulaire et une expression élevée de FGD1 corrèle avec une agressivité élevée de la tumeur (Ayala, Giacchetti et al. 2009).

En plus de réguler la formation des invadopodes, cdc42 régule également le niveau de MMP présentes dans ces structures. MT1-MMP est une métalloprotéinase transmembranaire pouvant digérer différents composants de la matrix extracellulaire et est capable d'activer pro-MMP2 (une autre MMP) par clivage protéolytique. MT1-MMP s'accumule sur les fronts de migration des cellules cancéreuses, particulièrement au sein des invadopodes (Poincloux, Lizarraga et al. 2009). Il a été montré dans les cellules MDA-MB-231 que l'activation de cdc42 permettait la fixation de son effecteur, IQGAP, sur des protéines du complexe exocyste au niveau des invadopodes. Le complexe exocyste est un complexe protéique impliqué dans le trafic vésiculaire, il est important pour l'exocytose ainsi que pour la croissance et la migration cellulaire. Une diminution de l'expression de IQGAP ou d'autres membres du complexe exocyste diminue le niveau de MT1-

MMP dans les invadopodes suggérant un rôle important de cdc42 et IQGAP dans l'adressage de MT1-MMP dans ces structures (Sakurai-Yageta, Recchi et al. 2008) (*Figure 14*).

## 2. Cdc42 dans la migration des cellules cancéreuses.

La motilité et la migration des cellules sont des phénomènes importants pour la formation de métastases. Les cellules peuvent migrer seules ou en groupes. Dans le cas où les cellules migrent seules, on retrouve fréquemment un phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

Durant cette transition, les cellules perdent leurs contacts entre elles et adoptent une morphologie plus mésenchymateuse, de type fibroblastique (cellules fusiformes ou étoilées avec le noyau allongé dans l'axe de la cellule) afin de traverser la matrix extracellulaire aidées par la sécrétion de protéinases (Yilmaz and Christofori 2010). Un des marqueurs de l'EMT est la perte de la E-cadhérine au profit de cadhérines mésenchymateuses telle que la N-cadhérine. Une conséquence de ce changement est le relargage de la membrane vers le cytoplasme de la caténine p120, une protéine liant la E-cadhérine. Une fois dans le cytoplasme, la caténine p120 réprime RhoA et active Rac et cdc42 pour favoriser le remodelage de l'actine (Noren, Liu et al. 2000, Cheung, Leung et al. 2010, Johnson, Seachrist et al. 2010).

De plus, l'activation de cdc42 via son effecteur MRCK, est nécessaire pour la phosphorylation de MLC2, pour la contractilité de l'actomyosine et l'invasion cellulaire (Wilkinson, Paterson et al. 2005). Ces observations confèrent à cdc42 un rôle important dans l'EMT et la migration des cellules. Il n'est donc pas étonnant que la GEF spécifique de cdc42 ARHGEF9 soit fréquemment surexprimée dans les carcinomes hépatocellulaires et que cette surexpression soit associée à une activation accrue de cdc42, une expression diminuée de la E-cadhérine et un phénotype mésenchymateux des cellules. Une inhibition de ARHGEF9 diminue l'activation de cdc42 et restaure un phénotype épithélial des cellules (Chen, Chan et al. 2010). Ces études suggèrent donc un rôle important de cdc42 dans l'EMT et la migration monocellulaire des cellules cancéreuses.

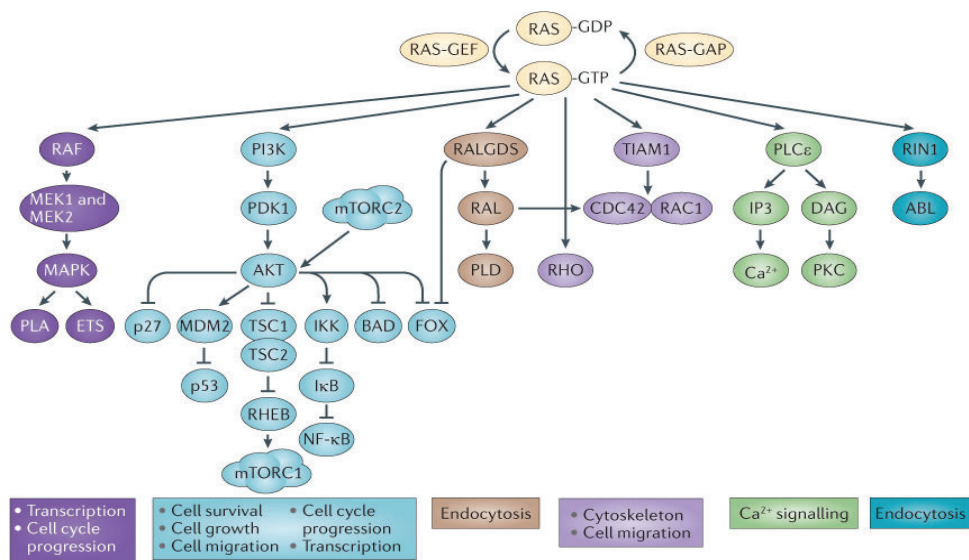
Un autre type de migration monocellulaire possible est la migration amiboïde. Dans ce cas, la cellule présente une forme arrondie, peu de sites d'adhésion et elle migre via des contractions actine-myosine dans des structures «finger-like», appelées historiquement pseudopodes. La migration au travers de la matrix extracellulaire est dans ce cas indépendante de réactions protéolytiques (Sahai 2005). L'activation de cdc42 permet l'activation de ses effecteurs PAK2 et N-WASP, démontrée comme importante pour la migration amiboïde de cellules de mélanomes (Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008).

Il est donc intéressant d'observer que cdc42 est nécessaire à la migration mésenchymateuse et à la migration amiboïde, cibler cdc42 pour bloquer l'invasion des cellules cancéreuses semble donc être un choix judicieux (*Figure14*).

En plus de la migration monocellulaire, les cellules peuvent migrer en groupe, un processus important pour le développement et la morphogenèse (Friedl and Gilmour 2009, Yilmaz and Christofori 2010). Au cours de cette migration, les cellules situées sur le front de migration ont un phénotype invasif et sécrètent des MMP afin de tracer le « chemin » aux cellules qui suivent.

Il est possible de créer un modèle de migration collective par l'expression de podoplanin dans les cellules du front de migration, surexpression retrouvée dans le front de migration de nombreux carcinomes. Dans ce cas, la migration des cellules se fait indépendamment de l'EMT et de cdc42, malgré l'importance de la formation de filipodes, un phénomène pourtant classiquement associé à l'activation de cdc42 (Wicki, Lehembre et al. 2006).

Une autre possibilité pour la migration collective commence avec l'initiation par des cellules stromales telles que des fibroblastes qui vont déformer la matrix extracellulaire et permettre ainsi aux cellules cancéreuses de migrer à leur tour (Gaggioli, Hooper et al. 2007). Dans ce modèle, l'activité de cdc42 est nécessaire à la migration des cellules de carcinomes suivant les fibroblastes. Le rôle de cdc42 dans ce type de migration reste donc assez flou et semble contexte dépendant.



**Figure 15: Les voies de signalisation activées par Ras.** Une fois activées, les protéines Ras activent de nombreuses voies de signalisation et sont par conséquent impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Berndt et al., 2011)



## IX) La transformation oncogénique par HRasV12 et l'impact de cdc42.

Au cours de nos travaux, nous avons développé un modèle cellulaire basé sur la transformation oncogénique de fibroblastes embryonnaires de souris immortalisés par l'oncogène HRas muté (HRasV12).

### A) L'oncogène Ras.

Les protéines Ras sont des petites GTPases de la superfamille Ras. Elles fonctionnent de la même façon que cdc42, en alternant entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Chez l'homme, vingt et un gènes constituent la sous-famille Ras. Seuls les trois membres canoniques HRas, NRas et KRas sont impliqués dans le cancer. Du fait de cette implication, ils ont été largement étudiés.

Ras est activé par de nombreux stimuli comme par exemple, les récepteurs aux facteurs de croissance. Dans son état activé, lié au GTP, Ras pourra activer deux grandes voies impliquées dans le cancer : la voie des MAP Kinase (MAPK) et la voie du PI3K (*Figure 15: Les voies de signalisation activées par Ras*) régulant ainsi diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la transcription, la survie cellulaire (Dempke and Heinemann 2010).

#### 1. La voie Ras/Raf/MEK/Erk

Lorsqu'il y a fixation du ligand sur un récepteur à tyrosine kinase (RTK), Ras va être activé soit par l'activation d'une GEF ou l'inactivation d'une GAP. Le mécanisme le mieux décrit passe par la GEF SOS (Son Of Sevenless). Le recrutement de SOS permet l'interaction avec Ras et son activation (McKay and Morrison 2007). Ainsi activé, Ras activera à son tour les protéines Raf qui activent alors les MAPKKs (MAP Kinase Kinase) MEK1 et MEK2 qui activeront à leur tour ERK1 et ERK2 par phosphorylation. Enfin la transmission finale du signal se fera lorsque ERK activera ses cibles cytoplasmiques ou nucléaires en fonction du RTK et du ligand engagé.

#### 2. La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation cellulaire impliquée dans de nombreux processus tels que la croissance et la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme et la réponse immunitaire. A l'état physiologique, cette voie permet l'intégration de signaux issus des récepteurs membranaires couplés à des tyrosines kinases (RTK) ou aux protéines G (RCPG). En réponse à la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur, celui-ci s'active par autophosphorylation et active une Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3K) qui convertit le Phospho-Inositide-4,5-biPhosphate (PIP2) membranaire en Phospho-Inositide-3,4,5-triPhosphate (PIP3). Ce dernier recrute alors, via son domaine PH (Pleckstrin Homology), les kinases PDK1 (Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) et AKT conduisant à l'activation de cette dernière par phosphorylation. AKT se dissocie alors de la membrane et peut phosphoryler ses nombreuses



cibles aussi bien membranaires, cytosoliques ou nucléaires impliquées dans la survie et la croissance cellulaire telles que p27, HDM2, IKK, ou BAD (Liu, Cheng et al. 2009).

Cette voie de signalisation peut être inhibée par la phosphatase PTEN (Phosphatase TENSin homologue) qui catalyse la conversion du PIP3 en PIP2. Une mutation activatrice de Ras entraîne une hyperactivation de cette voie.

## **B) La transformation oncogénique par HRasV12**

Ras est muté dans 20% des cancers (70 à 90% dans les cancers du pancréas, 50% dans les cancers du côlon et de 25 à 50% dans les cancers bronchiques (Downward 2003). Les mutations conduisent à un blocage de l'hydrolyse du GTP et ainsi à une activation constitutive de la protéine et donc à une activation non contrôlée des voies de signalisation en aval.

### **1. Mise en place de mécanismes de protection des cellules : la sénescence induite par Ras.**

Depuis les années 80, il est connu que l'expression ectopique d'oncogène comme Ras permet la transformation oncogénique de cellules de souris immortalisées mais que cette transformation est impossible dans les cellules primaires (Newbold and Overell 1983). De façon très surprenante, il a ensuite été démontré que l'expression de Ras dans ces cellules provoque leur sénescence (Serrano, Lin et al. 1997).

Initialement, la sénescence était une caractérisation fonctionnelle d'un état cellulaire particulier dans lequel les cellules sont sorties du cycle cellulaire de manière permanente et sont incapables de proliférer à nouveau (Campisi 1996). Les cellules en sénescence sont aplaties et élargies, avec un cytoplasme vacuolisé et une augmentation du volume nucléaire. Elles présentent une activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase en condition acide (pH 6,0) due à une accumulation de GLB1, une  $\beta$ -galactosidase lysosomale (Dimri, Lee et al. 1995, Lee, Han et al. 2006). Les cellules sénescents présentent également des perturbations chromatinienne avec l'apparition de foyers d'hétérochromatine. On retrouve dans ces cellules un niveau d'expression élevé de molécules favorisant la sortie du cycle cellulaire comme les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines p21, p16, p15 et p14/19ARF (Alcorta, Xiong et al. 1996, Collado, Gil et al. 2005).

Les premières observations de cellules sénescents ont été faites in vitro, dans des cellules primaires. Après plusieurs passages, les cellules atteignaient un état d'épuisement de la prolifération, donnant naissance à la notion de sénescence réplivative (Hayflick 1965). Un phénotype identique a ensuite été identifié en réponse à l'expression de Ras activé (Serrano, Lin et al. 1997) ou à des endommagements de l'ADN (Di Leonardo, Linke et al. 1994), suggérant de fortes similitudes dans les mécanismes mis en place lors de la sénescence réplivative ou celle induite par les stress. Dans les cellules humaines, la sénescence réplivative est expliquée par l'érosion des télomères à chaque division cellulaire jusqu'à un stade où les extrémités des

chromosomes sont reconnus comme des endommagements de l'ADN entraînant la sénescence par l'intermédiaire de ATM/p53 (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003).

Le processus de sénescence induit par un oncogène est appelé OIS (Oncogene-Induced Senescence) qui est une forme de sénescence prématurée. Il est observé après l'expression de Ras mais également d'autres oncogènes comme Raf, mos et cdc6 (Zhu, Woods et al. 1998, Dimri, Itahana et al. 2000). Les mécanismes expliquant pourquoi seulement certains oncogènes entraînent la sénescence des cellules ne sont toujours pas totalement compris, mais il semble que cela soit dû à l'activation spécifique d'effecteurs en amont des oncogènes en question.

Dans le cas de Ras, les mécanismes mis en place dans l'induction de la senescence peuvent être divisés en 3 groupes :

- **La répression des cibles de E2F.** Les protéines p16 et p21 sont des suppresseurs de tumeur. Elles sont en particulier impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en senescence. La protéine p53 régule de façon directe et positive l'expression de p21. Les mécanismes régulant l'expression de p16 sont moins clairs. En conditions physiologiques, p16 n'est pas exprimée dans les tissus à l'âge adulte. Son expression est réprimée par la protéine BMI-1. L'activation de la voie MAPK par Ras entraîne l'activation de p38 qui va phosphoryler 3pK qui à son tour phosphorylera BMI-1 levant l'inhibition de l'expression de p16 (Bracken, Klein-Kohlbrecher et al. 2007). La protéine p16 ainsi induite est alors capable de se lier et d'inhiber les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) prévenant la formation du complexe CDK4/Cycline D1 inhibant ainsi la phosphorylation inhibitrice de Rb par ce complexe. En présence de p16, la protéine Rb est fixée sur E2F prévenant la transcription des gènes cibles impliqués dans la réplication. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S qui conduira par la suite à l'entrée des cellules en sénescence. De plus, les gènes cibles pro-prolifératifs des E2F sont retrouvés dans des structures d'hétérochromatine non transcrite après une expression de Ras, un processus dépendant de Rb (Narita, Nunez et al. 2003).
- **Activation de la réponse aux endommagements de l'ADN.** La surexpression de Ras entraîne une réplication aberrante de l'ADN provoquant l'activation de la réponse aux endommagements de l'ADN dans les cellules primaires. L'activation de cette voie est nécessaire à l'induction de la sénescence (Di Micco, Fumagalli et al. 2006, Mallette, Gaumont-Leclerc et al. 2007). L'expression d'oncogènes dans ces cellules provoque une réplication aberrante de l'ADN ainsi que la production de ROS expliquant l'activation de cette voie (Heyworth, Knaus et al. 1993).
- **Mise en place d'un profil sécrétoire particulier.** Les cellules sénescents présentent un profil sécrétoire particulier, le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Deux études ont montré que les cellules sénescents

sécrètent IGFBP7 (Insuline-like Growth Factor Binding Protein 7) (Wajapeyee, Serra et al. 2008) et PAI1 (Plasmonogen Activator Inhibitor 1) (Kortlever, Higgins et al. 2006). Ces molécules réduisent l'activation de la voie MAPK (IGFBP7) et PI3K (PAI1), permettant l'entrée des cellules en sénescence. Il a également été démontré que la production de IL-6, IL-8 et du récepteur CXCR2 par les cellules sénescents permet de renforcer leur arrêt en sénescence (Acosta, O'Loghlen et al. 2008, Kuilman, Michaloglou et al. 2008). Des études ont cependant révélé un autre aspect du SIPS et ont montré que les molécules sécrétées par les cellules sénescents pouvaient créer un microenvironnement pro-tumoral pour les cellules épithéliales, c'est le cas notamment de l'IL-6, l'IL-8 et MMP-3 (Krtolica, Parrinello et al. 2001).

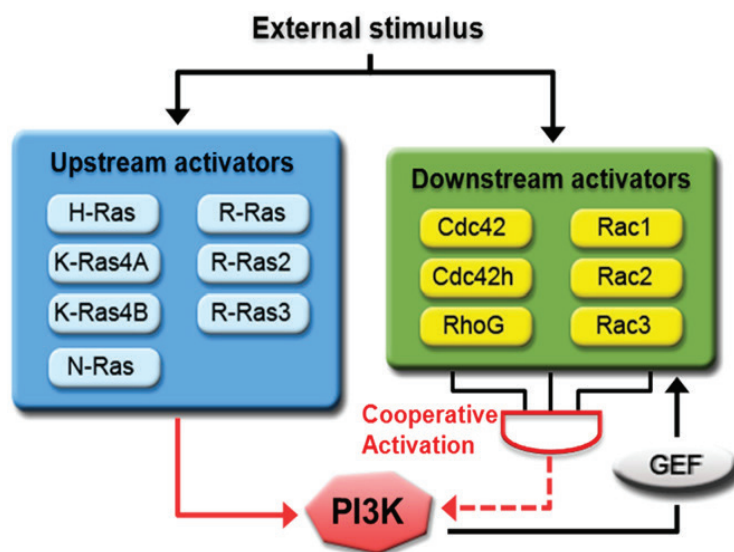
La sénescence apparaît alors comme un mécanisme de protection, permettant aux cellules d'échapper à la transformation oncogénique. Pour que la transformation oncogénique ait lieu, l'expression d'un oncogène tel que Ras doit être associée à un autre événement comme la perte d'un des effecteurs de l'induction de la sénescence ou d'un gène suppresseur de tumeur comme p53 ou Rb. Un exemple d'échappement de la sénescence induite par HRasV12 est la coopération des protéines Twist1 et Twist2. Une étude a en effet révélé que ces protéines permettent de contrecarrer l'induction de la sénescence induite par HRasV12 en bloquant les voies de signalisation régulées par p53 et Rb (Ansieau, Bastid et al. 2008). Les auteurs ont également montré que dans ce cas, en plus de permettre l'échappement de la sénescence, la coopération entre HRas et les protéines Twist permettait d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules, favorisant leurs capacités invasives.

Il existe également des processus de coopération entre cdc42 et HRas, permettant la mise en place de mécanismes importants pour la transformation oncogénique.

## 2. Coopération entre HRas et cdc42 dans la transformation oncogénique.

Les premières études montrant une coopération de cdc42 dans la transformation oncogénique par Ras ont été menées dans les fibroblastes de rats Rat1. En effet, dans ces cellules, l'expression d'un dominant négatif de cdc42 empêche la formation de colonies en milieu semi-solide entraînée par l'expression de HRasV12, un mutant constitutivement actif de HRas (Qiu, Abo et al. 1997). Plusieurs études ont ensuite démontré que cdc42 était activé par l'expression de formes oncogéniques de Ras et que cette activation avait un impact sur la signalisation induite par Ras. En effet, il a été montré que cdc42 liait et activait PI3K (Zheng, Bagrodia et al. 1994) et un de ses effecteurs en aval, PAK, peut phosphoryler à la fois Raf1 et MEK, augmentant ainsi la signalisation MAPK via ERK (Beeser, Jaffer et al. 2005).

Une inhibition de la transformation oncogénique de HRasV12 par des mutants dominants négatifs de cdc42 a également été démontrée dans des fibroblastes humains. Dans ce modèle,



**Figure 16: Boucle d'amplification de la voie PI3K.** Une activation coordonnée de différents activateurs (protéines Ras) est nécessaire pour une activation efficace de la voie PI3K en réponse à un stimulus externe. Ceci va permettre l'activation des différents effecteurs tels que les RhoGTPases. Une boucle d'amplification va alors pouvoir se mettre en place, grâce à une activation coordonnée et coopérative de ces différentes RhoGTPases. Ceci explique la non redondance des RhoGTPases et la difficulté de déterminer le rôle spécifique de chacune d'elles (Yang et al., 2012).

l'expression de mutant constitutivement actif de cdc42 seul ne suffit pas pour induire une transformation, mais son activité est nécessaire à la transformation par HRasV12. Il est également intéressant de noter que dans ce modèle, une étude du transcriptome par micro-puce a montré que l'inhibition de cdc42 diminuait l'expression de facteurs importants pour l'angiogenèse tel que le VEGF (Appledorn, Dao et al. 2010). Une étude menée dans les cellules de cancer colorectal Caco-2 a montré une augmentation de la migration des cellules ainsi que de la production de filopodes spécifique de cdc42 en réponse à l'expression d'un mutant constitutivement actif de KRas (Makrodonouli, Oikonomou et al. 2011).

Une boucle d'activation de la voie PI3K a été également décrite. En effet, une étude a décrit le rôle des différentes Ras et RhoGTPases dans l'activation de cette voie en aval de la signalisation des RTK (Yang, Shin et al. 2012). Cette étude a montré qu'une coopération de plusieurs Ras était nécessaire à l'activation initiale de PI3K qui activait ensuite différentes RhoGTPases qui doivent à leur tour coopérer pour créer une boucle d'amplification de la voie PI3K (*Figure 16: Boucle d'amplification de la voie PI3K*). En réponse à un stimulus externe, des GEFs importantes pour l'activation de HRas, KRas, NRas et RRas sont recrutées à la membrane et les activent (Chardin, Camonis et al. 1993, Mochizuki, Yamashita et al. 2001). Une fois PI3K activée, le PIP3 accumulé recrute des GEFs spécifiques des Rho comme Tiam1 (Fleming, Gray et al. 2000) et Vav2 (Han, Luby-Phelps et al. 1998) permettant l'activation de RhoGTPases en aval telles que Rac1, Rac2, Rac3, cdc42, RhoG qui entraînent la polymérisation d'actine et permettent l'amplification de l'activation de PI3K de façon coopérative. Dans ce modèle, l'état d'activation individuel des RhoGTPases n'a pas d'importance, il faut une activation coordonnée de ces dernières pour que la boucle d'amplification soit effective. Ceci explique la non redondance des RhoGTPases et pourquoi il est complexe de déterminer le rôle spécifique de chacune d'entre elles dans ce phénomène. Durant la migration cellulaire, de nombreuses études ont montré une accumulation et une activation de PI3K et de ses activateurs au sein des fronts de migration. Ceci pourrait suggérer la nécessité de la mise en place de cette boucle d'amplification de PI3K pour que les cellules puissent migrer correctement.

Une étude a montré qu'il existait au niveau cellulaire deux « pool » de HRasV12 avec une localisation différente. En effet, cette équipe a identifié une localisation au niveau des endo-membranes de HRasV12 (Cheng, Li et al. 2011). Une expression de HRas exclusivement localisée au niveau des endo-membranes est toujours capable de transformer les cellules NIH3T3. L'expression d'un mutant dominant négatif de cdc42 dans ces cellules bloque la transformation par HRas endo-membranaire. De plus, il a été montré une interaction et une activation de cdc42 avec HRas dans les endo-membrane qui est augmentée lorsque HRas est associé au GTP ou après stimulation par des facteurs de croissance. A l'inverse, lorsqu'un mutant constitutivement actif de HRas est exprimé seulement à la membrane plasmique, il n'active pas cdc42 et entraîne l'apparition de marqueurs de sénescence dans les fibroblastes de prépuce humain BJ. L'expression d'un mutant actif de HRas exprimé seulement à la membrane plasmique transforme

faiblement les cellules NIH3T3 mais la transformation oncogénique est augmentée lorsqu'un mutant constitutivement actif de cdc42 est co-exprimé. Il semble donc que pour être efficace dans la transformation oncogénique, HRas doit interagir avec cdc42 au niveau des endo-membranes et une coopération entre les différents compartiments de HRas est nécessaire.

# Résultats

## I) Objectifs de la thèse

Des études corrélatives d'échantillons tumoraux ont montré que l'agressivité des tumeurs ou la mauvaise réponse des cellules tumorales à un traitement chimiothérapeutique n'était pas corrélé au niveau d'expression de cIAP1 mais à sa localisation nucléaire (voire chapitre IV.A). Ces études suggèrent que cIAP1 ait une fonction nucléaire et que cette fonction soit importante à son activité oncogénique.

Les travaux antérieurs de mon équipe d'accueil a montré que cIAP1 est une protéine nucléaire dans les cellules souches de la moelle osseuse et dans les cellules non différenciées de l'épithélium colique, de la peau, de cardiomyocytes de rats nouveaux-nés. Lors de la différenciation, cIAP1 est relocalisé dans le cytoplasme (Plenchette, Cathelin et al. 2004, Didelot, Lanneau et al. 2008). Cette exclusion nucléaire de cIAP1 est associée à l'arrêt de prolifération des cellules, suggérant que dans le noyau, cIAP1 pourrait contrôler la prolifération. Cette relocalisation est dépendante d'une séquence d'export nucléaire NES localisée dans le domaine CARD. Une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Carmen Garrido, a mis en évidence l'implication des protéines chaperonnes dans la régulation des IAP (Didelot, Lanneau et al. 2008). cIAP1 interagit spécifiquement avec l'isoforme  $\beta$  de HSP90 (Heat Shock Protein 90). HSP90 accompagne cIAP1 lors de sa relocalisation nucléo-cytoplasmique au cours de la différenciation. Une inhibition de HSP90 conduit à une dégradation rapide de cIAP1 par le complexe du protéasome. HSP90 joue donc un rôle de chaperon stabilisateur de cIAP1. Ces deux localisations subcellulaires de cIAP1 suggèrent des fonctions bien distinctes dans ces deux compartiments.

La fonction cytoplasmique de cIAP1 lors de la différenciation macrophagique a été investiguée. Ce processus de différenciation nécessite une activation transitoire de NF- $\kappa$ B, l'activation soutenue conduisant à la différenciation en cellules dendritiques. Une fois dans le cytoplasme, cIAP1 contrôle le niveau d'activation de NF- $\kappa$ B en induisant l'ubiquitination et la dégradation de l'adaptateur moléculaire TRAF2. Dans les macrophages bien différenciés, la régulation de TRAF2 par cIAP1 permet la réponse optimale des cellules et la sécrétion de cytokines à une stimulation par le CD40L (Dupoux, Cartier et al. 2009).

Afin d'identifier de nouvelles fonctions de cIAP1 ; des recherches à grande échelle de partenaires de cIAP1 ont été menées. Différents partenaires ont été identifiés. Mon travail a porté sur deux de ces partenaires : le facteur de transcription E2F1 et cdc42, une petite protéine G de la famille des Rho. J'ai ensuite initié un travail ayant pour but de déterminer si ces nouveaux partenaires pouvaient contribuer aux propriétés oncogéniques de cIAP1.



## II) Analyse de l'interaction de cIAP1 avec le facteur de transcription E2F1.

### A) cIAP1 régule le facteur de transcription E2F1 et la prolifération cellulaire. Article 1.

Article 1 :

« Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1 (cIAP1) Can Regulate E2F1 Transcription Factor-mediated Control of Cyclin Transcription »

The Journal of Biological Chemistry, Juillet 2011.

Ce travail a été initié par Jessy Cartier, alors étudiante en thèse dans l'équipe.

Le facteur de transcription E2F1 est un important régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose. Il permet la progression des cellules dans le cycle et peut, en réponse à des endommagements de l'ADN induire l'apoptose (Introduction, D).

Dans ce premier projet, nous avons mis en évidence la régulation de l'activité transcriptionnelle de E2F1 par cIAP1.

L'interaction de cIAP1 et de E2F1 a été confirmée *in cellulo* par immuno-précipitation (Article 1, Figure 1, E) et *in vitro* par des techniques de chromatographie d'affinité sur billes de sépharose-gluthation (Article 1, Figure 1, B, C, D).

Les domaines d'interaction ont été recherchés, l'interaction de la région contenant les domaines BIR de cIAP1 avec la région contenant le domaine de liaison à l'ADN de E2F1 (Article 1, Figure 1, F, G) a été montrée.

Des expériences de gènes rapporteurs ont montré une régulation positive de l'activité transcriptionnelle de E2F1 par cIAP1 sur un promoteur synthétique contenant 5 sites de fixations E2F et aussi sur les promoteurs des cyclines E et A (Article 1, Figure 2, B, C, D). cIAP1 et E2F1 interagissent pendant toutes les phases du cycle cellulaire. Cependant des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine ont montré que cIAP1 et E2F1 étaient, ensemble, recrutés au niveau des promoteurs des cyclines A et E, uniquement en phase S du cycle cellulaire (Article 1, Figure 5, B, C, D). De plus, nous avons montré que cIAP1 était indispensable au recrutement de E2F1 sur ces promoteurs (Article 1, Figure 6, D). Enfin, l'influence de cIAP1 sur le niveau d'expression ARN et protéine de la cycline E et A puis sur la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses a été montré (Article 1, Figure 7, Figure 8).

Mon travail a consisté à confirmer l'interaction des deux protéines, le recrutement de cIAP1 sur les promoteurs des cyclines A et E, la capacité de cIAP1 à stimuler E2F1 et la transcription des

cyclines A et E dans d'autres modèles cellulaires incluant différentes lignées de cellules tumorales et des cellules primaires mammaires (*Article 1, Figure 1E, 4A, 4C, 6C, Supplementary Figure 5*). J'ai montré que la capacité de cIAP1 à contrôler E2F1 n'était observée que dans les modèles cellulaires qui présentent une expression nucléaire de cIAP1 (*Article 1, Figure 7C, 7D, 7E*).

Cette activité n'est pas retrouvée dans des fibroblastes embryonnaires de souris exprimant cIAP1 exclusivement dans la fraction cytoplasmique.

La restauration de l'expression de cIAP1 dans le noyau de fibroblastes déficients pour cIAP1 (MEF cIAP1<sup>-/-</sup>) a permis de confirmer son activité sur le facteur de transcription et sur la prolifération cellulaire (*Article 1, Figure 7F, 7G, 8F, Supplementary Figure 6*).

(Dimerization Partner 1), which favors DNA binding and the recruitment of a number of other proteins (33, 34) that behave as activators or repressors (33–35). One of the functions of cIAP1 in the nucleus appears to be part of the molecular machinery that regulates the transcriptional activity of E2F1 on *CCNE* and *CCNA* promoters.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture, Chemicals, and Treatments**—Human mammary epithelial cells (HMEC) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and grown into HMEC ready medium (Invitrogen). Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were provided by J. Silke (Melbourne, Australia). THP1, HT-29, U-2 OS, and CaSki cell lines were grown into RPMI 1640 and MEF and HeLa cells in DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza). Cells were synchronized using 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich) double block. Human CD34<sup>+</sup> progenitor cells were prepared from human umbilical cord blood (Etablissement Français du Sang) as previously described (36), cultured over 7 days in StemSpan<sup>TM</sup> H3000, supplemented with 100 ng/ml rhFlt-3 ligand, 100 ng/ml rhSCF, 20 ng/ml rhIL-3, and 20 ng/ml rhIL-6 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), and then differentiated for 2 weeks into CD14<sup>+</sup> monocytic cells by exposure to 25 ng/ml M-CSF (StemCell Technologies) before ChIP experiments. The pan-caspase inhibitor zVAD-fmk was from Sigma-Aldrich.

**Transfections, Plasmid Constructs, and siRNA**—THP-1 cells were nucleoporated using the AMAXA nucleofector kit V (Amaxa Biosystems, Lonza). Stable THP1 clones expressing cIAP1 antisense were enriched by a 10-day geneticin selection (0.5 mg/ml). Cells were transfected using JET PEI (Polyplus transfection, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Interferin (PolyPlus transfection, Ozyme) transfection reagent. DNA constructs used were pcDNA, pcDNA-cIAP1, pcDNA-cIAP1 in antisense orientation (AS), pcDNA-cIAP2, pcDNA-XIAP, pEGFP, pEGFP-cIAP1, pCI, pCI-cIAP1, pCI-cIAP1-H588A, pGL3, pGL-5x E2F-BS, pGL-human *CCNA* promoter, pGL-human *CCNE* promoter wt and mutated in E2F binding sites, pCMV-E2F1, pcDNA-E2F2 and E2F-3a. pGEX-based constructs (cIAP1, cIAP1-BIR1–3 (amino acid 1–483), cIAP1-CARD-RING (amino acid 452–618), E2F1, E2F1 amino acid 284–437, E2F1 amino acid 89–191, E2F1 amino acid 41–108, E2F1 amino acid 41–127) were obtained by cloning PCR-generated DNA sequence into pGEX 4T1 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). FLAG-cIAP1 constructs were generated by cloning cIAP1-full length, cIAP1-BIR1–3, cIAP1-CARD-RING in a FLAG-pCR3 vector (Invitrogen). The cIAP1 L47A mutant was generated by site-directed mutagenesis. RNA oligonucleotides used were cIAP1, E2F1, and control siRNA sequence designed and purchased from Qiagen.

**Cell Extracts, Immunoprecipitation, and Western Blot Analysis**—Cell lysates and immunoblot analysis were performed as described (6). Nuclear- and cytoplasm-enriched fractions were obtained as described (25).

Primary antibodies used were rabbit anti-human cIAP1 (R&D Systems, Lille, France), GFP (BD Biosciences, Le Pont de

Claix, France), TRAF2 (Stressgen), PARP, E2F1, E2F2 and E2F3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), goat anti-human cIAP1, XIAP (R&D systems), GST (Rockland, PA), mouse anti-human cIAP2 (R&D systems), cyclin A, cyclin E (BD Biosciences), cyclin B, Rb (Cell signaling Technology, Danvers, MA), and HSC70 (Santa Cruz Biotechnology) monoclonal antibodies. Secondary antibodies included goat HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat, or rabbit anti-goat immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Bar Harbor, ME).

For immunoprecipitation, cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 20 mM EDTA; 0.5% Nonidet P-40; 1 mM DTT, and protease inhibitors and incubated overnight at 4 °C under shaking in the presence of anti-E2F1 Ab (C-20, Santa Cruz Biotechnology) or anti-cIAP1 Ab (R&D Systems) coupled to Sepharose G-protein beads (Amersham Biosciences, GE Healthcare) or ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinity Agarose Gel (Sigma-Aldrich). Beads were washed and resuspended in Laemmli 1× buffer before immunoblot analysis. The co-precipitation experiments were performed in HeLa cells transfected with FLAG constructs and pCMV-E2F1.

**Antibody Array**—HeLa cells were transfected with pEGFP-NES\*-cIAP1 (25). The cell lysate was deposited onto a Cell Cycle antibodyArray<sup>TM</sup> (Hypromatrix, Worcester, MA) containing 60 specific antibodies against cell cycle-related proteins following the manufacturer's instructions and immunoblotted with anti-GFP biotin (USBiological, Swampscott, MA) and biotin-HRP (Invitrogen) antibodies.

**GST-Pull-down Assay**—GST fusion proteins were produced in *Escherichia coli*, immobilized on glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences), and incubated with either HeLa cell lysates or *in vitro* translated [<sup>35</sup>S]methionine-labeled cIAP1 protein or recombinant human E2F1 protein (Protein One, Bethesda, MD). The bound proteins to GST-cIAP1 constructs were revealed by immunoblotting. The bound proteins to GST-E2F1 constructs were revealed by immunoblotting or by 10% SDS-PAGE and autoradiography.

**Gene Reporter Assay**—Cells were transfected with 500 ng of pGL-based constructs, 50 ng of pCMV β-gal reporter vector, and 500 ng of IAP constructs, and/or 100 ng of E2F constructs. Cells were harvested 48 h after and analyzed for luciferase activity using the luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI) and a luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Thoiry, France). Results were normalized to the β-galactosidase activity using the β-Galactosidase Enzyme Assay System kit (Promega).

**RNA Purification, Reverse Transcription, PCR, and Real-time PCR (qPCR)**—Total RNA was isolated using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) or TRIzol Reagent (Invitrogen), reverse transcribed by MMLV reverse transcriptase with oligo(dT) primers (Promega). Specific cDNAs were amplified on an iCYCLER thermocycler (Bio-Rad) or a 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SyBr Green detection protocol. Results were compared with the cyclophilin or HPRT DNA amplification. Primers used for the specific amplification are available upon request. For RT-PCR, the one-step RT-PCR kit (Qiagen) and the iCYCLER thermocycler (Bio-Rad) were used.

**Chromatin Immunoprecipitation Assay**—Cells were formaldehyde cross-linked, and DNA was isolated and sonicated.

## cIAP1 Is a Transcriptional Co-regulator of E2F1

Samples were immunoprecipitated using rabbit or goat anti-human cIAP1 (R&D systems), rabbit anti-human E2F1 (C-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-AcH3, or DiMeH3K9 pAbs (Upstate, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), washed, and reverse cross-linked using the chromatin immunoprecipitation kit EZ CHIP from Upstate (Millipore). For the sequential CHIP experiment, samples were first immunoprecipitated with anti-E2F1 pAb. The antibody-bound protein/DNA complexes were eluted using elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>), and a second CHIP was performed using the anti-cIAP1 pAb. PCR and real-time PCR were performed as described above using primers flanking the E2F binding site in *CCNE* and *CCNA* promoters.

**Cell Cycle Analysis**—Cells were incubated for 30 min in the presence of 3 mM BrdU (Sigma Aldrich). Cells were fixed at 4 °C and resuspended in 30 mM HCl and 0.5 mg/ml pepsin for 30 min, then in 2 M HCl over 15 min, stained with primary anti-BrdU Ab, and with secondary anti-mouse Alexa Fluor 488 Ab (Molecular Probes, Invitrogen) and propidium iodide (PI, 10 µg/µl). Cell cycle repartition was assessed by LSRII flow cytometry using FlowJo® Softwares (Tree Star, Inc. Ashland, OR).

**Proliferation Analysis**—We used CellTrace™ CFSE Cell Proliferation kit (for HeLa Cells) or Click-iT™ EdU Cell Proliferation Assay (for HMEC and MEF) (Molecular Probes, Invitrogen) to measure cell proliferation using a LSRII flow cytometer (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The index of proliferation was measured using ModFIT Software (Verity Software House Topsham, ME). THP1 cells were plated at the same density and counted each day.

**Statistical Analysis**—Student's *t* test was used for statistical analysis.

## RESULTS

**cIAP1 Interacts with E2F1 through Its BIR Domains**—cIAP1 has been identified in the nucleus of human normal cells, *e.g.* hematopoietic stem cells (25), as well as cancer cells (15, 16, 28, 30). It is also expressed in the nucleus of human colon carcinoma HT-29, human leukemia monocytic THP1 (25, 26), and human epithelial cervix carcinoma HeLa (27) (Fig. 1A) cell lines. To identify nuclear partners of cIAP1, cells were transfected with a GFP-tagged-cIAP1 in which the NES had been mutated to force the nuclear overexpression of the protein (25), and cell lysates were incubated on an antibody array targeting 60 cell cycle-related proteins. Among the 18 detected positive hits, 7 were checked using a higher stringency approach in which GST-cIAP1 is incubated with a cell lysate from untransfected HeLa cells and interactions revealed by immunoblot analysis (Fig. 1B, supplemental Fig. S1A). TRAF2 was used as a positive control (Fig. 1B). Three potential partners were confirmed, namely TTK kinase, Rad52 (supplemental Fig. S1A), and E2F1 transcription factor (Fig. 1B). The GST pull-down experiment also confirmed a negative result of the initial screen, *i.e.* cIAP1 did not interact with the E2F1 repressor retinoblastoma protein (Rb) (Fig. 1B). The reversed GST-pull-down assay demonstrated a binding of endogenous cIAP1 with GST-E2F1 (Fig. 1C). We also detected a very weak binding of cIAP2 and XIAP on GST-E2F1 (Fig. 1C). GST-cIAP1 can inter-

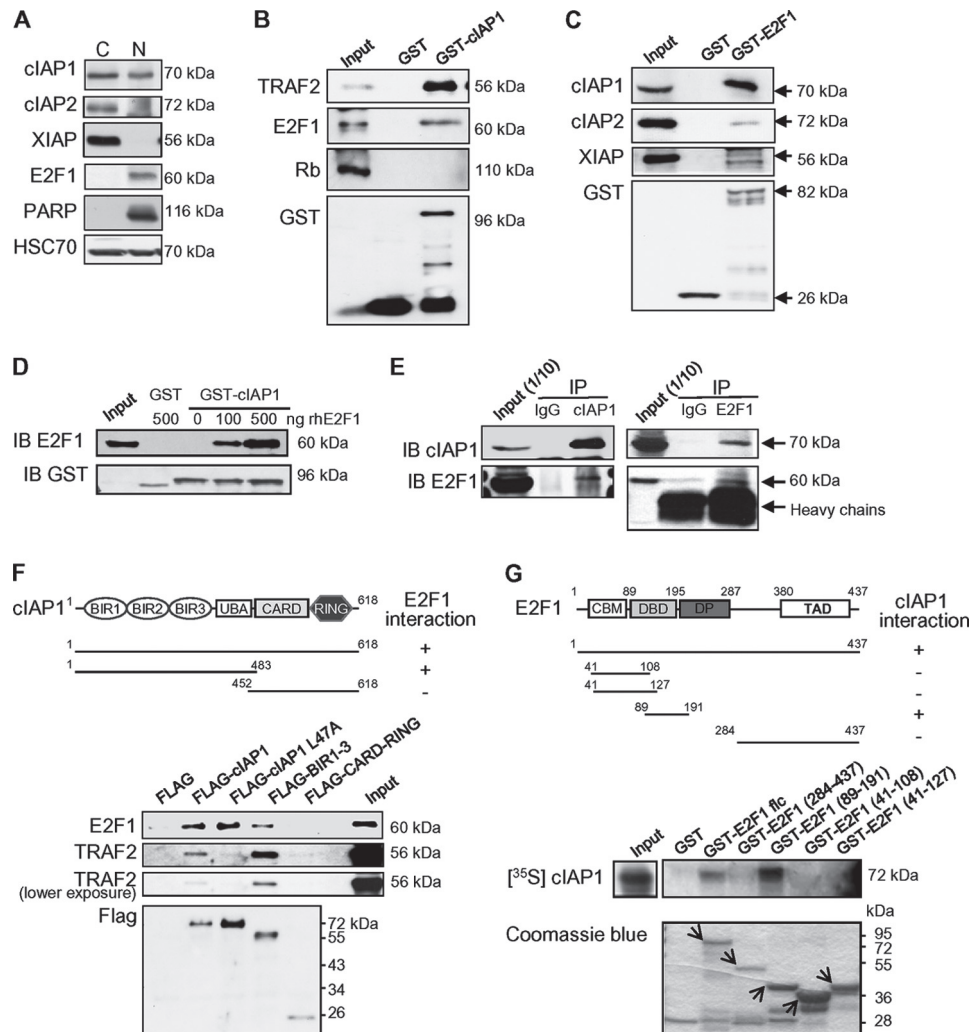
act with purified human E2F1 protein, indicating a direct interaction (Fig. 1D). cIAP1 was co-expressed with E2F1 in the HeLa cell nucleus-enriched fraction whereas cIAP2 and XIAP were detected in the cytoplasm (Fig. 1A). The *in vivo* interaction of E2F1 with cIAP1 was confirmed by co-immunoprecipitation (Fig. 1E).

We then mapped the protein domains required for this interaction by using a co-immunoprecipitation experiment (Fig. 1F) and GST-pull down assay (Fig. 1G and supplemental Fig. S1, B and C). As TRAF2, E2F1 interacted with cIAP1 full-length and with the N-terminal part of the protein that contained BIR 1–3 domains but did not interact with the C-terminal part of cIAP1 that included the CARD and the RING domains (Fig. 1F and supplemental Fig. S1, B and C). Mutation L47A within the BIR1 domain that abolished the cIAP1-TRAF2 interaction (37) did not modify the cIAP1-E2F1 interaction (Fig. 1F). We detected an *in vivo* interaction of cIAP1 with TRAF2 in the nucleus- and in the cytoplasm-enriched fractions by immunoprecipitation (supplemental Fig. S1D). An *in vitro* competition experiment indicated that E2F1 and TRAF2 could compete for cIAP1 binding (supplemental Fig. S1E). GST-pull down assay performed by using *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled full-length cIAP1 and GST-E2F1 or GST-E2F1 deletion constructs demonstrated that cIAP1 interacted with the E2F1 amino acid sequence 89–191 that overlaps its DNA binding domain (DBD) (Fig. 1G).

**cIAP1 Stimulates E2F1 Transcriptional Activity**—Overexpression or silencing of cIAP1 did not significantly alter the expression level of E2F1 (Fig. 2A). In a luciferase gene reporter assay using a construct containing 5x E2F binding sites upstream of the *LUCIFERASE* gene, overexpressed cIAP1 dramatically enhanced E2F1 transcriptional activity, which was still observed when a mutation was introduced within the RING domain (H588A) of cIAP1 to abrogate its E3 ubiquitin ligase activity (Fig. 2B). We then analyzed the influence of cIAP1 on *CCNE* and *CCNA* promoters, which are two well-identified E2F1 target genes. cIAP1 significantly stimulated *CCNE* gene expression in a dose-dependent manner on its own (Fig. 2C) and substantially enhanced E2F1 activity on *CCNE* (Fig. 2D) and to a lower extent *CCNA* (Fig. 2E) gene promoters. Again, mutation within the RING (H588A) domain or within the BIR1 domain (L47A) that inhibits cIAP1-TRAF2 interaction (Fig. 1F) did not inhibit the capacity of cIAP1 to stimulate E2F1 activity (Fig. 2D and supplemental Fig. S2A). Mutation of E2F binding sites I, II, and III (38) in the *CCNE* promoter of the reporter construct abolished the transcriptional activity of both cIAP1 and E2F1 and prevented the synergistic effect of cIAP1 and E2F1 (Fig. 2F), suggesting that cIAP1 transcriptional effect depended on intact E2F binding sites. These results were confirmed in HT-29 human colon carcinoma cells that harbor a mutated p53 and in U-2 OS osteosarcoma cells that express wild-type p53 (supplemental Fig. S2, B and C). The capacity of cIAP1 to stimulate cyclin E expression was confirmed by RT-qPCR (Fig. 2G, supplemental Fig. S3) and immunoblotting (Fig. 2I) in HeLa (Fig. 2G) and HT-29 (Fig. 2I, supplemental Fig. S3) and silencing of E2F1 decreased the capacity of cIAP1 to stimulate *CCNE* mRNA expression (Fig. 2H).

We then compared the capacity of cIAP1, cIAP2, and XIAP to stimulate E2F1 activity. Overexpression of cIAP1 decreased





**FIGURE 1. cIAP1 interacts with the transcription factor E2F1.** *A*, immunoblot analysis of cIAP1, cIAP2, XIAP, and E2F1 in cytoplasm (C) and nuclear (N)-enriched fractions. PARP is used to check the nuclear fraction. HSC70: loading control. *B–D*, GST pull-down analysis of the interaction of GST-cIAP1 (*B*, *D*) or GST-E2F1 (*C*) with indicated proteins from HeLa cell lysate (*B*, *C*) or with purified human E2F1 (*D*). *E*, endogenous E2F1 (*right panel*) or cIAP1 (*left panel*) were immunoprecipitated with anti-E2F1, anti-cIAP1 or irrelevant rabbit Ig (IgG) in HeLa cells before immunoblot analysis of cIAP1 and E2F1. The cIAP1 immunoprecipitation (*left*) was performed in a nuclear-enriched fraction. *F*, immunoprecipitation analysis of the interaction of wild type or deletion mutants of cIAP1 with E2F1 and TRAF2. FLAG-conjugated proteins and E2F1 were expressed in HeLa cells and co-immunoprecipitated using anti-FLAG M2-agarose beads, then revealed by immunoblotting using an anti-E2F1, anti-TRAF2, or anti-FLAG specific antibody. A schematic representation of cIAP1 protein structure and deletion constructs used is shown (*upper panel*). *G*, GST-pull down analysis of the interaction of *in vitro* translated [<sup>35</sup>S]methionine-labeled cIAP1 with indicated GST-E2F1 deletion constructs. The interactions were revealed by autoradiography. E2F1 mutants (*arrows*) were detected after Coomassie Blue staining of the gel (*lower panel*). A schematic representation of E2F1 domains and deletion constructs used is shown (*upper panel*). CBM: cyclin A binding motif; DBD: DNA binding domain; DP: dimerization domain; TAD: C-terminal transactivation domain. Representative experiments are shown.

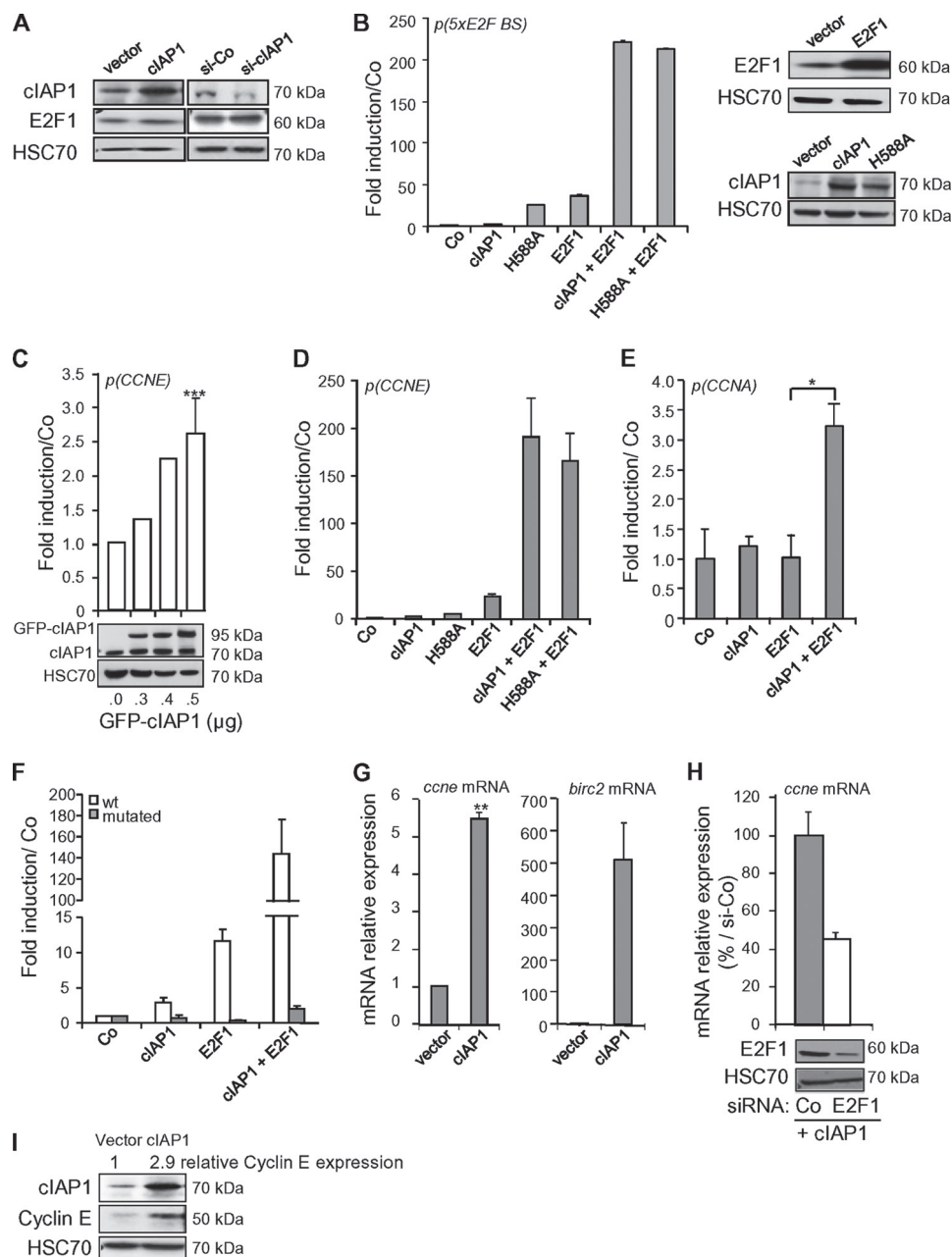
the expression of cIAP2 and XIAP (Fig. 3A), accordingly to the capacity of cIAP1 to ubiquitinylation and stimulate the degradation of its close relatives (39). cIAP2 and XIAP were much less efficient than cIAP1 for stimulating E2F1 activity on synthetic and CCNE promoters (Fig. 3, A and B). cIAP1 could also stimulate E2F2 and E2F3a, other so-called stimulatory members of the E2F family, although more weakly than E2F1 (Fig. 3C).

**cIAP1 Is Recruited on the CCNE Promoter**—To explore whether cIAP1 could bind to the CCNE promoter, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) using primers that flanked the E2F binding site of the promoter. Primers located inside the CCNE gene sequence are used as a negative control. As expected, E2F1 is recruited on the E2F binding site of the CCNE promoter (Fig. 4, A and B). cIAP1 was detected on the E2F binding site of the CCNE promoter in HeLa, U-2 OS,

HT-29, THP1 cell lines and in primary human mammary epithelial cells (HMEC) (Fig. 4, A and C) whereas neither cIAP1 nor E2F1 bound the DNA sequence of the CCNE gene (Fig. 4, B and C). The same approach was used to demonstrate that cIAP1 could also bind the E2F binding site of the CCNA promoter in the cell line and in primary human CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells (Fig. 4D). ChIP with E2F1 antibody and a Re-ChIP using cIAP1 antibody demonstrated that cIAP1 and E2F1 were recruited at the same promoter region of the CCNE gene (Fig. 4E). These data suggested that cIAP1 was a component of the E2F1 transcriptional complex.

**cIAP1 Recruitment on Cyclin Gene Promoters Is Cell Cycle-regulated**—To determine whether cIAP1-E2F1 interaction could be cell cycle-regulated, HeLa cells were synchronized in early S phase by a thymidine double block ([supplemental Fig. S4](#)).

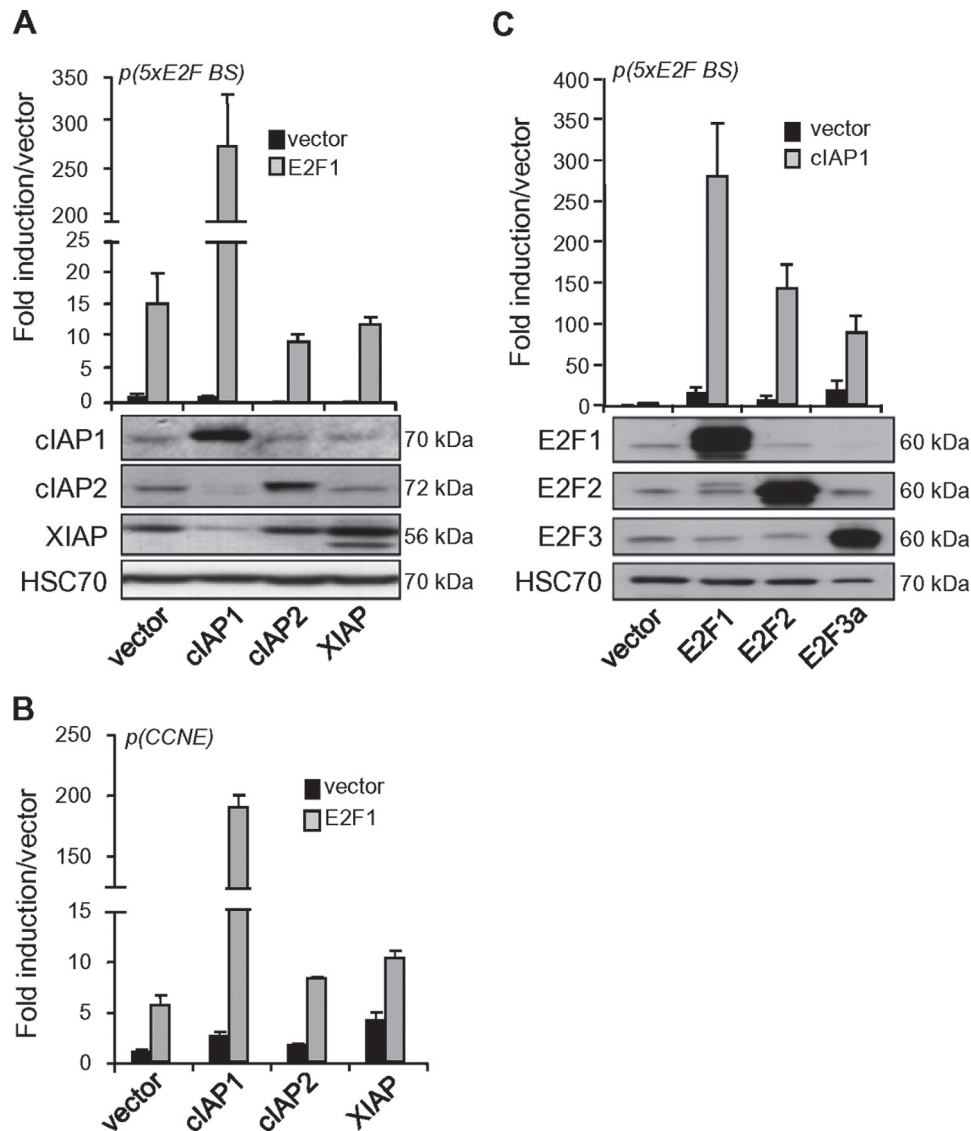
## cIAP1 Is a Transcriptional Co-regulator of E2F1



**FIGURE 2. cIAP1 stimulates E2F1 transcriptional activity.** *A*, immunoblot analysis of cIAP1 and E2F1 in HeLa cells transfected with cIAP1 construct or cIAP1 siRNA. HSC70: loading control. *B–F*, gene luciferase experiments performed in HeLa cells transfected with indicated promoter-luciferase reporter plasmids, along with control (Co) or E2F1-encoding vector and/or 500 ng or indicated amount (C) of empty (Co), cIAP1 or H588A (*B, D*) encoding constructs.  $p(5x2F\ BS)$ : synthetic promoter containing 5x2F binding sites (*B*);  $p(CCNE)$  & wt: wt CCNE promoter (*B–D, F*);  $p(CCNA)$ : CCNA promoter (*E*); mutated: E2F binding site-mutated CCNE promoter. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by empty vector alone. Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment. Statistical analysis performed using Student's *t* test. \*\*\*:  $p = 0.0003$ ,  $n = 10$  (*C*); \*:  $p = 0.013$ ,  $n = 3$  (*E*). cIAP1 and E2F1 overexpression were checked by immunoblot analysis (*B* right panels, *C* lower panel). *G* and *H*, quantitative RT-PCR analysis of CCNE or *birc2* mRNA in HeLa cells transfected with empty or cIAP1 encoding vectors and/or E2F1-siRNA (*si-E2F1*). Results are normalized to HPRT mRNA and expressed relative to empty vector (*G*) or expressed as % of CCNE mRNA induced by cIAP1 in the presence of control siRNA (*H*). Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment. Statistically significant differences (\*\*,  $p = 0.007$ ,  $n = 3$ , Student's *t* test) (*G*). *I*, immunoblot analysis of cIAP1 and cyclin E in HT-29 cells transfected with cIAP1 construct. The relative expression of cyclin E in cIAP1-transfected cells compared with empty vector as evaluated after quantification using ImageJ software was shown on the blot. HSC70: loading control.

The G2/M phase reached 8 h after block release was characterized by a decrease in cyclin E and an increase in cyclin B expression (Fig. 5A). The expression of cIAP1 (Fig. 5A), its subcellular localization (not shown), and its interaction with E2F1 (Fig. 5B) did not change significantly along the cell cycle progression. As observed for E2F1 (Fig. 5C, left panel; supplemental Fig. S5A), cIAP1 was mainly recruited on the CCNE promoter in early S

phase (Fig. 5D, left panel; supplemental Fig. S5A). Both cIAP1 and E2F1 were also recruited onto the CCNE promoter in late S phase (Fig. 5, C and D, left panels; supplemental Fig. S5A). The recruitment of E2F1 and cIAP1 onto the CCNA promoter was also cell cycle-regulated and occurred later in S phase (Fig. 5, C and D, right panels; supplemental Fig. S5A). cIAP1 and E2F1 were observed to bind the CCNA promoter in primary human



**FIGURE 3. Specific activity of cIAP1 on E2F1.** Gene luciferase experiments performed in HeLa cells transfected with a synthetic promoter containing 5x E2F binding sites (*p(5x E2F BS)*) (A, C) or CCNE promoter-luciferase reporter plasmid (*p(CCNE)*) (B) along with E2F1 (A–C), E2F2 or E2F3a constructs (C), and/or 500 ng of empty vector or cIAP1 (A–C), cIAP2- or XIAP (A, B)-encoding constructs. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by empty vector alone. Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment is shown. The expression of indicated constructs was checked by immunoblot analysis (lower panels). HSC70: loading control. One representative experiment is shown.

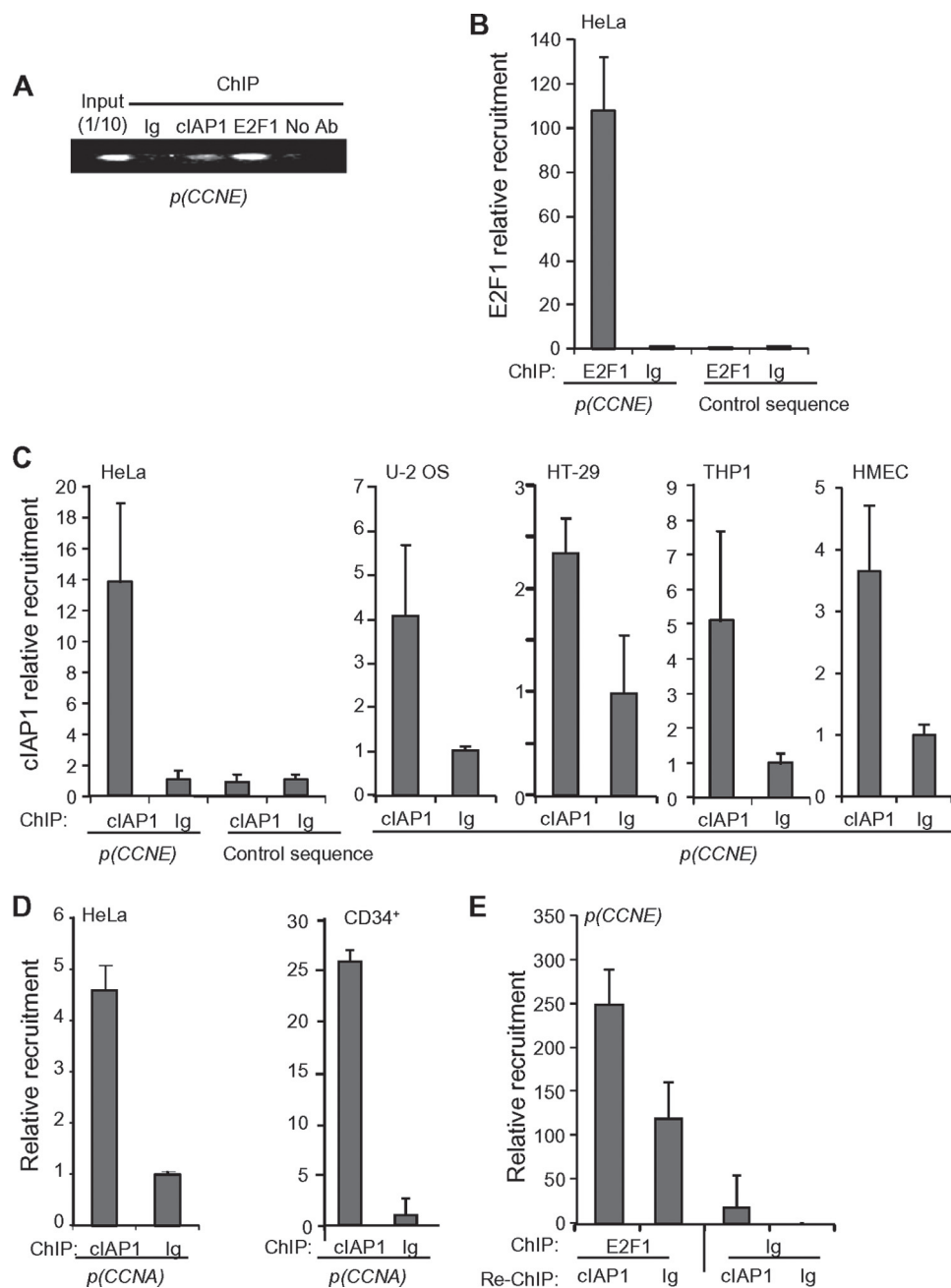
CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells (Fig. 5E). In accordance with the previously described exclusion of cIAP1 from the nucleus in cells undergoing differentiation (25), this recruitment is decreased when CD34<sup>+</sup> cells were induced to differentiate into CD14<sup>+</sup> monocytes upon M-CSF exposure (Fig. 5E).

**cIAP1 Is Required for E2F1 Binding to the CCNE Promoter—**Silencing of cIAP1 in HeLa cells using siRNA (Fig. 6, A–D) inhibited the capacity of E2F1 to stimulate the transcriptional expression of CCNE (Fig. 6A, left panel), and completely abolished the recruitment of cIAP1 and E2F1 on the CCNE promoter (Fig. 6, C and D, left panel). Interestingly, silencing of E2F1 (Fig. 6B) also inhibited the recruitment of cIAP1 (Fig. 6D, right panel). We confirmed these results in the CaSki human epidermoid cervical carcinoma cell line expressing the amplicon 11q21, which contains the *birc2* gene (16). As expected, we observed a very high expression of cIAP1 in both nucleus and cytoplasm-enriched fraction compared with HeLa cells (Fig.

6E). cIAP1 was also recruited on the cyclin E promoter, and silencing of cIAP1 prevented the recruitment of E2F1 on the CCNE promoter (Fig. 6F, supplemental Fig. S5B). Moreover, cIAP1 siRNA decreased the acetylation of histone H3 on the CCNE promoter that accompanied the transcriptional activation and increased the dimethylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9), which is a feature of transcriptional repression (Fig. 6G) (40).

**cIAP1 Modulates Cyclin Expression and Cell Proliferation—**We analyzed the influence of cIAP1 on cyclin expression. siRNA-mediated down-regulation of cIAP1 decreased cyclin E and A mRNA (Fig. 7, A and B) and protein (Fig. 7C) expression in HeLa cells (Fig. 7, A–C) and in primary human mammary epithelial cells (Fig. 7C). A similar effect was observed by down-regulating cIAP1 with an antisense (AS) oligonucleotide construct in THP1 cells (Fig. 7C). Silencing of cIAP1 also decreased the cyclin E transcript in CaSki, B16F10

## cIAP1 Is a Transcriptional Co-regulator of E2F1

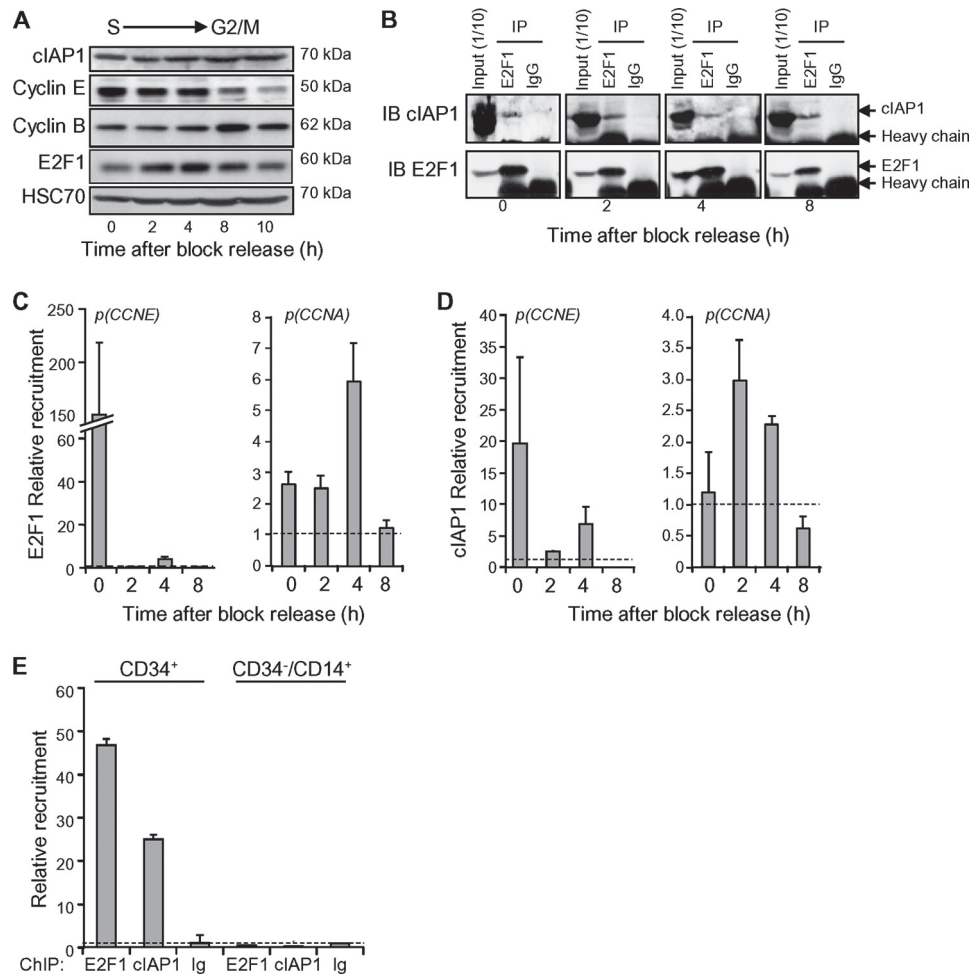


**FIGURE 4. cIAP1 is recruited on E2F binding site of CCN promoters.** Chromatin immunoprecipitation experiments performed using an anti-E2F1 (A, B, E), anti-cIAP1 (A, C–E), or an irrelevant antibody (Ig) in HeLa (A–E), U-2 OS, HT-29, THP1, HMEC (C), and CD34<sup>+</sup> primary myeloid cells (D). The genomic DNA region encompassing one E2F binding site of the CCNE (p(CCNE)) (B, C, E), CCNA (p(CCNA)) promoters (D) or a control sequence localized in CCNE gene (B, C left panels) were amplified by PCR (A) or qPCR (B–E). E, ChIP and re-ChIP experiments performed on HeLa cells. The sample was first immunoprecipitated with E2F1 or irrelevant antibody (Ig). The protein–DNA complex was eluted, and a second ChIP was performed using cIAP1 or irrelevant Ab. Results were normalized to input and expressed as relative recruitment compared with irrelevant antibody. Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment.

mouse melanoma and in L929 mouse fibroblast cell lines (Fig. 7D). We did not detect such an effect in murine embryonic fibroblast (MEF) (Fig. 7D), and MEF from deleted mice (MEF cIAP1<sup>-/-</sup>) did not show a decrease in the cyclin E transcript and protein when compared with wild-type MEF (supplemental Fig. S6, A and B). The cell fractionation experiment revealed that, in contrast to HeLa (Fig. 1A), HMEC (Fig. 7E), CaSki (Fig. 6E), B16F10, and L929 cell lines (Fig. 7E) in which cIAP1 is detected in the nuclear-enriched fraction, the expression of cIAP1 is almost restricted to the cytoplasm compartment in MEF (Fig. 7E), especially in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S

phase of the cell cycle, when E2F1 activity is maximal (supplemental Fig. S6C). Transfection of MEF cIAP1<sup>-/-</sup> with a cIAP1 construct induced cIAP1 expression in both nuclear and cytoplasm compartments (Fig. 7F) and enhanced E2F1 activity (supplemental Fig. S6D) and cyclin E expression (Fig. 7G). The analysis of cell proliferation and cell cycle repartition showed that down-regulation of cIAP1 (Fig. 7C) slowed down the cell proliferation (Fig. 8, A and B), decreased S phase of cell cycle (Fig. 8C) and increased G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Fig. 8, C and D in HeLa (Fig. 7C and Fig. 8, A, C, D) and THP1 (Fig. 7C and Fig. 8, B and D) cells. We did not detect any sign of





**FIGURE 5. The recruitment of cIAP1 on CCN promoters is cell cycle-regulated.** A–D, HeLa cells were synchronized into early S phase by a thymidine double block and analyzed 0, 2, 4, 8, and 10 h after block release (see also supplemental Figs. S4 and S5). A, immunoblot analysis of cIAP1, cyclin E and B and E2F1. HSC70: loading control. B, endogenous E2F1 was immunoprecipitated with anti-E2F1 or irrelevant rabbit Ig (IgG) before immunoblot analysis of cIAP1 and E2F1. C and D, ChIP experiments of E2F1 (C) or cIAP1 (D) on *CCNE* ( $p(CCNE)$ ) (C and D left panels) or *CCNA* ( $p(CCNA)$ ) (C and D right panels) promoter. E, ChIP of E2F1 and cIAP1 on *CCNA* promoter performed in undifferentiated (CD34<sup>+</sup>) and M-CSF-differentiated (CD34<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup>) myeloid cells. The genomic DNA region encompassing the E2F-binding site of *CCNE* or *CCNA* promoter was amplified by qPCR. Results were normalized to input and expressed as relative recruitment to irrelevant antibody (dotted line). Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment.

apoptosis (not shown), and the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk did not affect the capacity of cIAP1-siRNA to decrease HeLa cell growth rate (Fig. 8A). Moreover, the effect of cIAP1-siRNA on cell proliferation could be reverted by co-expression of the cIAP1-encoding vector (Fig. 8A). Silencing of cIAP1 (Fig. 7C) also decreased the proliferation rate as evaluated by 24 h EdU incorporation in primary HMEC (Fig. 8E). Moreover, expression of cIAP1 in the nuclear compartment of MEF cIAP1<sup>-/-</sup> (Fig. 7F) stimulated cell proliferation (Fig. 8F).

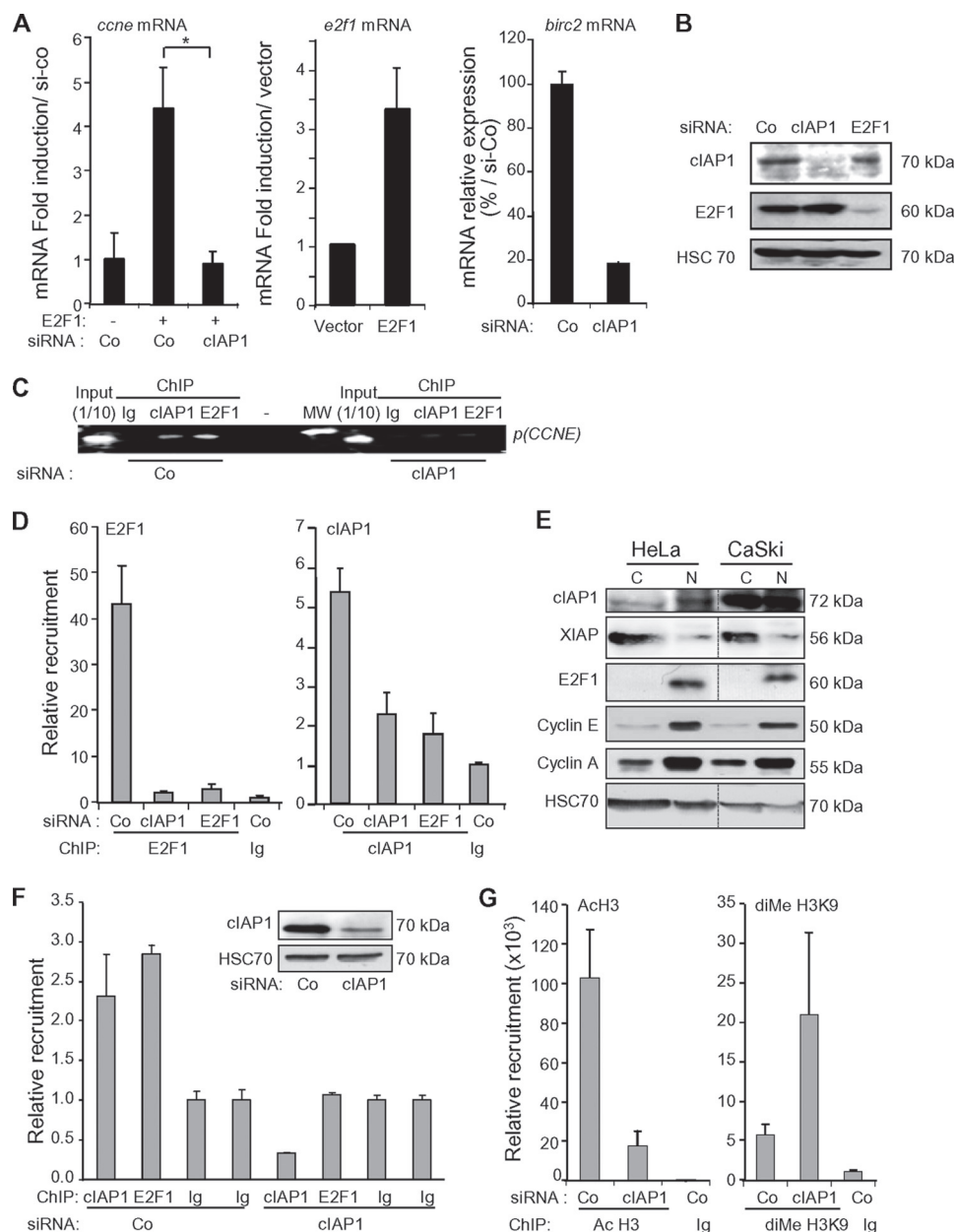
## DISCUSSION

In contrast to its closest homologs cIAP2 and XIAP that are localized in the cytoplasm, cIAP1 is expressed in the nucleus of a majority of normal cells until terminal differentiation (25, 27, 29) and in the nucleus of many cancer cells (15, 16, 25–28, 30). The present report identifies a nuclear function for cIAP1. The protein appears to be a co-regulator of E2F1-dependent transcriptional activity.

The E2F family of transcription factors includes 8 members subdivided into subgroups based on structural and

functional homologies. These transcription factors are potent cell cycle regulators through their capacity to regulate the expression of genes involved in G1-S phase transition, including *CCNE* and *CCNA* genes. E2F proteins promote either activation or repression of gene transcription, depending on the target gene, the pattern of co-regulator partners, and the cellular context (34, 41–43). Molecular partners affect E2F1 transcriptional activity *e.g.* Rb interaction with E2F1 is associated with transcription inhibition (44, 45). We show that cIAP1 binds a protein sequence of E2F1 (amino-acids 89–191) that overlaps with its DNA binding domain and favors E2F1-mediated transcriptional activation of *CCNE* and *CCNA* genes. cIAP1 appears to be important for optimal E2F1 mediated-cyclin E expression. Silencing of cIAP1 inhibits the recruitment of E2F1 on *CCNE* promoter, suggesting that cIAP1 is required for DNA binding of E2F1. Another molecular partner of E2F whose heterodimerization promotes the transcription factor binding to gene promoters is the co-activator DP1 (32, 46). We did not detect an interaction of cIAP1 with DP1 and DP1 did not

## cIAP1 Is a Transcriptional Co-regulator of E2F1

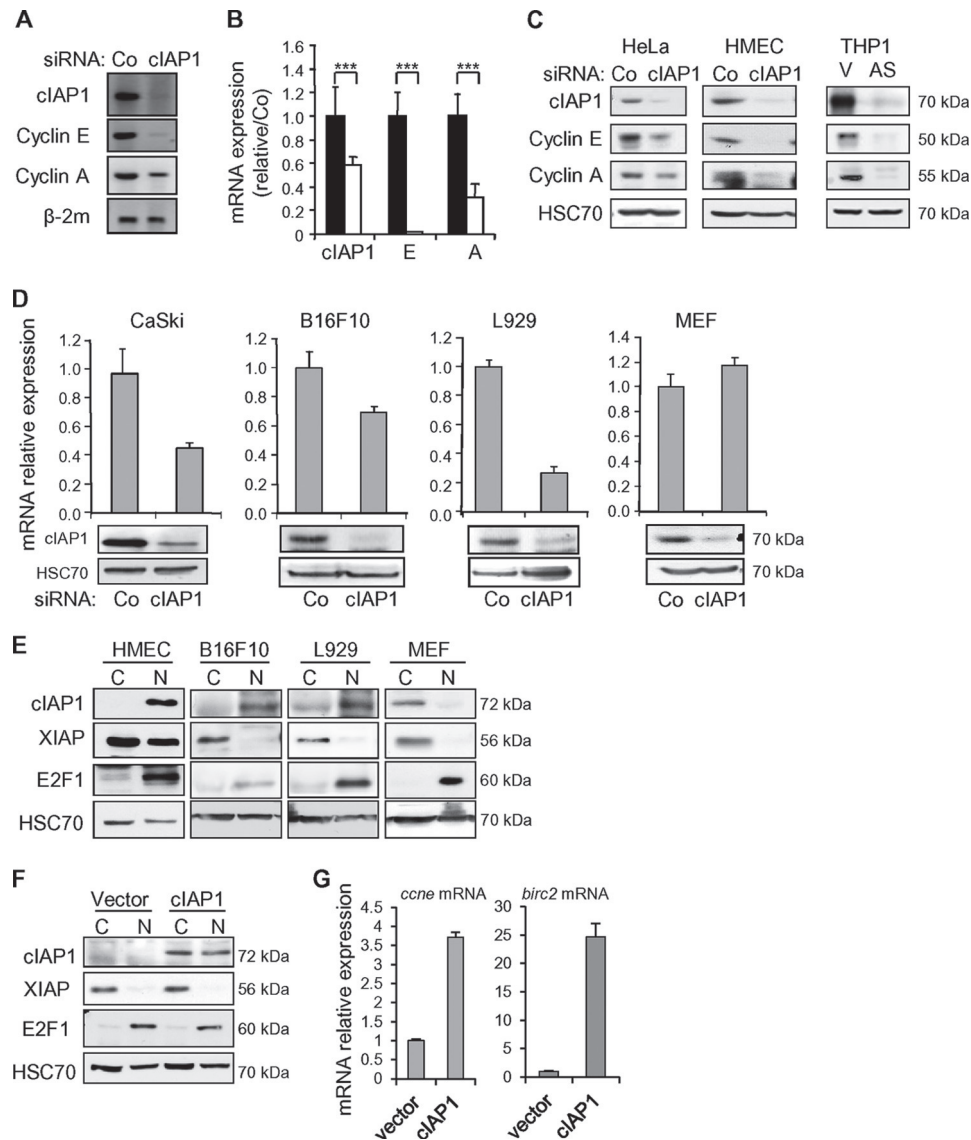


**FIGURE 6. Contribution of cIAP1 in the transcriptional activity of E2F1.** A, quantitative RT-PCR analysis of *ccne* (right panel), *e2f1* (middle panel), and *birc2* (left panel) mRNAs in HeLa cells transfected with empty or E2F1-encoding vector and control (Co) or cIAP1-targeted siRNA. Results were normalized to cyclophilin mRNA and expressed relative to empty vector. Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment. Statistically significant differences (\*,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Student's  $t$  test). B, efficacy of cIAP1 or E2F1-targeted siRNAs was checked by an immunoblot analysis. HSC70: loading control. C, D and F, G, chromatin immunoprecipitation experiments performed using an anti-E2F1 or an anti-cIAP1 (C, D, F), an anti-acetyl histone H3 (Ac H3) or an anti-dimethyl histone H3 on lysine 9 (diMe H3K9) (G) or an irrelevant antibody (Ig) in HeLa (C, D, G) or CaSki (F) cells. The genomic DNA region encompassing the E2F-binding site of the CCNE promoter was amplified by PCR (C) or qPCR (D, F, G). Results are normalized to input and expressed as relative recruitment compared with irrelevant antibody. Mean  $\pm$  S.D. of one representative experiment (D, F, G) is shown. MW: molecular weight. The efficacy of cIAP1-targeted siRNAs was checked by an immunoblot analysis (F, upper panel). HSC70: loading control. E, immunoblot analysis of cIAP1, XIAP, E2F1, cyclin E, and cyclin A in the cytoplasm (C)- and nucleus (N)-enriched fractions of HeLa and CaSki cells. HSC70: loading control.

affect the capacity of cIAP1 to stimulate E2F1 (not shown). cIAP1 can directly interact with E2F1 in all stage of cell cycle. However, the recruitment of cIAP1 on the cyclin gene promoter is cell cycle-regulated, peaking when the E2F1 activity is maximal. Additional partners or protein modifications may be required for the binding of this heterodimer to DNA at specific phases of the cell cycle.

cIAP1 acts in collaboration with the TRAF2 protein to regulate the TNFR signaling pathway. TRAF2 is also observed to be

associated with cIAP1 in the nuclear compartment (supplemental Fig. S1D). However, mutation within the BIR1 domain of cIAP1 that abolishes its binding to TRAF2 does not interfere with the capacity of cIAP1 to interact and stimulate E2F1, suggesting that the transcriptional regulation activity of cIAP1 is independent of TRAF2. Most of the cIAP1 functions identified so far involve its E3 ubiquitin ligase activity (1, 3, 47, 48). The ability of cIAP1 to promote E2F1 transcriptional activity could have been related to the ubiquitination of E2F1 or other E2F1



**FIGURE 7. Down-regulation of cIAP1 modulates cyclin expression.** cIAP1 was down-regulated in HeLa (A–C), HMEC (C) CaSki, B16F10, L929 cells or MEF (D) by using siRNA (A–D) or in THP1 by transfecting an cIAP1 antisense (AS) encoding construct (C). A, RT-PCR analysis of indicated mRNAs. β-2 microglobulin (β-2m) was used as control. B, RT-qPCR analysis of *ccne* (E) and *ccna* (A) mRNAs. Results are normalized to cyclophilin mRNA. Statistically significant differences (\*\*\*)  $p < 0.005$ ,  $n = 5$ , Student's *t* test). C, immunoblot analysis of indicated proteins in HeLa and HMEC cells transfected with cIAP1 siRNA or in THP1 transfected with an cIAP1 antisense (AS) encoding construct. HSC70: loading control. D, upper panels, RT-qPCR analysis of *ccne* mRNA in indicated cell lines. Results are normalized to cyclophilin mRNA. Lower panels, immunoblot analysis of cIAP1. HSC70: loading control. E, immunoblot analysis of cIAP1, XIAP, and E2F1 in the cytoplasm (C)- and nucleus (N)-enriched fractions of indicated cell lines. HSC70: loading control. F, immunoblot analysis of cIAP1, XIAP, and E2F1 in the cytoplasm (C)- and nucleus (N)-enriched fractions of MEF cIAP1<sup>-/-</sup> transfected with cIAP1 construct. HSC70: loading control. G, RT-qPCR analysis of *ccne* and *birc2* mRNA in MEF transfected with the cIAP1 construct. Results are normalized to cyclophilin mRNA.

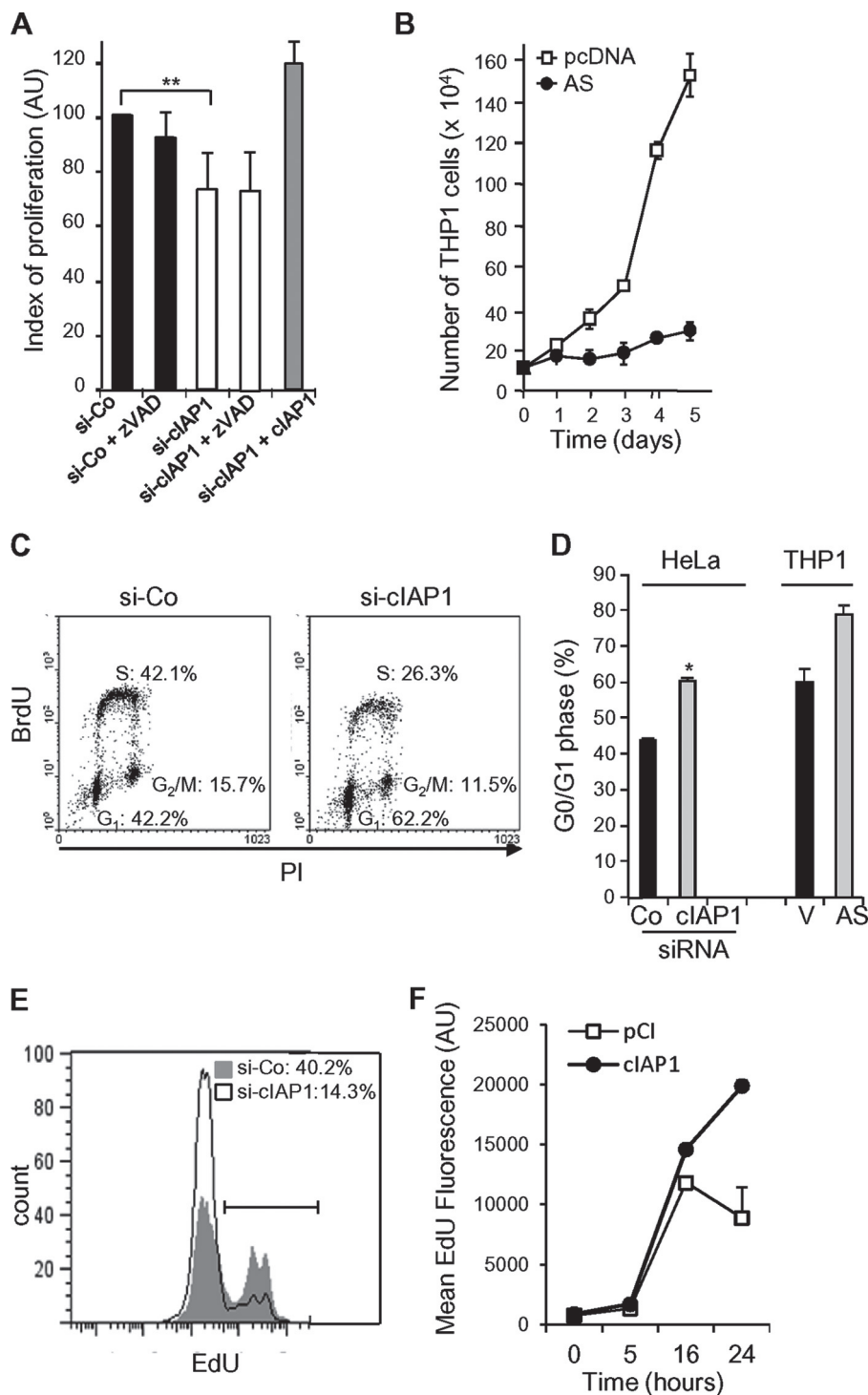
molecular partners. Actually, we did not detect a ubiquitination of E2F1 by cIAP1 (not shown), and a mutation that suppressed this E3 ligase activity did not abolish the ability of cIAP1 to stimulate the E2F1 transcriptional activity in a luciferase gene reporter assay.

MEFs from animals in which the studied gene has been deleted is a useful tool to check the function of a studied protein. Unfortunately, these cells could not be used to explore the ability of cIAP1 to promote E2F1 transcriptional activation as cIAP1 is localized in the cytoplasm of these differentiated cells (supplemental Fig. S5), in accord with our previous observation that cIAP1 migrates from the nucleus to the cytoplasm in cells undergoing terminal differentiation (25, 26). We show that nuclear cIAP1 is recruited on the *CCNA* gene promoter in

undifferentiated hematopoietic stem cells and cannot be detected on this promoter in monocytes obtained by M-CSF-induced differentiation of these cells. Redistribution of cIAP1 from the nucleus to the cytoplasm could favor the decrease in cell proliferation and cell cycle exit that characterizes terminal cell differentiation. Additional studies will indicate whether this redistribution of cIAP1 could also favor the repression, inhibition, or degradation of E2F1 that is required for normal occurrence of differentiation in several cellular models (44, 49, 50).

The influence of cIAP1 on tumor development has been well demonstrated in several mouse carcinoma models (18, 23, 24). Down-regulation of cIAP1 decreases tumor cell growth *in vivo* (18, 23, 24) and decreases the proliferation in human breast

## *cIAP1 Is a Transcriptional Co-regulator of E2F1*



**FIGURE 8. Down-regulation of cIAP1 modulates cell proliferation and cell cycle repartition.** *A*, flow cytometry analysis of cell proliferation in HeLa cells transfected with control (si-Co) or cIAP1 (si-cIAP1) siRNA and cIAP1-encoding construct in the presence or not of zVAD-fmk 10  $\mu$ M. Results: mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Statistically significant differences (\*\*,  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ , Student's  $t$  test). *B*, cell proliferation was assessed by cell counting in THP1 clone transfected with empty or cIAP1 antisense (AS)-encoding construct as in Fig. 7C. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. *C* and *D*, cell cycle analysis in HeLa cell transfected with Co or cIAP1-siRNA. The cell cycle is evaluated in by flow cytometry after BrdU and PI staining of cells. *D*, percentage of cell in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle as analyzed by flow cytometry in HeLa cells transfected with control (Co) or cIAP1 siRNA or in THP1 cells transfected with empty vector (V) or an cIAP1 antisense encoding vector (AS). Mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments is shown. Statistically significant differences (\*,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Student's  $t$  test). *E*, flow cytometry analysis of EdU incorporation in HMEC cells transfected with control (si-Co) or cIAP1 (si-cIAP1) siRNA as in Fig. 7C. One representative experiment was shown. *F*, flow cytometry analysis of EdU incorporation in MEF cIAP1<sup>-/-</sup> transfected with cIAP1 encoding construct as in Fig. 7F. One representative experiment is shown.

cancer cell line MCF-7 (51) and mouse primary carcinoma cells (24). Accordingly, we also observe a decrease in cell proliferation after cIAP1 down-regulation, which is accompanied by a

decrease in cyclin E and A expression. Interestingly, the murine hepatocellular carcinoma harboring 9qA1 amplicon, which contains *cIAP1*-, *cIAP2*-, and *yap1*-encoding genes were



observed to overexpress cyclin E (18). Moreover, a recent report showed that the 9A1 amplicon could be substituted by an inactivation of the E2F-repressor Rb in p53<sup>-/-</sup> mouse mammary carcinogenesis (24). The ability of clAP1 to promote E2F1-mediated transcription activity of CCN genes, whose overexpression was associated with poor prognosis in several tumor types (52), could account for the oncogenic properties of the protein.

**Acknowledgments**—We thank Dr. D. Cress, Dr. B. Henglein, Dr. K. Katula, Dr. G. Leone, Dr. J. Lees, Dr. P. Meier, Dr. R. Pestell, Dr. J. Silke, Dr. R. Weinberg, and Dr. K.M. Yao for kindly providing plasmids and the cell line, Dr. N. Droin for efficient help in real-time PCR analysis, Shweta Tyagi for advice with the ChIP experiment, and Lydie Desoche for technical assistance. We are grateful for the use of the cytometry platform (IFR100, Dijon, France). We are grateful to Pascal Meier for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Dubreix-Daloz, L., Dupoux, A., and Cartier, J. (2008) *Cell Cycle* **7**, 1036–1046
- Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010) *Nat. Rev. Cancer* **10**, 561–574
- Varfolomeev, E., and Vucic, D. (2008) *Cell Cycle* **7**, 1511–1521
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kaya-gaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J. N., Elliott, L. O., Wallweber, H. J., Flygare, J. A., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., Dixit, V. M., and Vucic, D. (2007) *Cell* **131**, 669–681
- Vince, J. E., Wong, W. W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Condon, S. M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B. A., Koentgen, F., Vaux, D. L., and Silke, J. (2007) *Cell* **131**, 682–693
- Dupoux, A., Cartier, J., Cathelin, S., Filomenko, R., Solary, E., and Dubreix-Daloz, L. (2009) *Blood* **113**, 175–185
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J. D. (2002) *Nature* **416**, 345–347
- Vince, J. E., Chau, D., Callus, B., Wong, W. W., Hawkins, C. J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C. A., Condon, S. M., Chunduru, S. K., Yeoh, G., Brink, R., Vaux, D. L., and Silke, J. (2008) *J. Cell Biol.* **182**, 171–184
- Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Cheung, H. H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W. C., Mak, T. W., Korneluk, R. G., and Cheng, G. (2008) *Nat. Immunol.* **9**, 1371–1378
- Zhao, Y., Conze, D. B., Hanover, J. A., and Ashwell, J. D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 7777–7782
- Tang, E. D., Wang, C. Y., Xiong, Y., and Guan, K. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 37297–37305
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreaux, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith, J. B., Morris, S. J., and Barker, P. A. (2008) *Mol. Cell* **30**, 689–700
- Park, S. M., Yoon, J. B., and Lee, T. H. (2004) *FEBS Lett.* **566**, 151–156
- Snijders, A. M., Schmidt, B. L., Fridlyand, J., Dekker, N., Pinkel, D., Jordan, R. C., and Albertson, D. G. (2005) *Oncogene* **24**, 4232–4242
- Imoto, I., Yang, Z. Q., Pimkhaokham, A., Tsuda, H., Shimada, Y., Imamura, M., Ohki, M., and Inazawa, J. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6629–6634
- Imoto, I., Tsuda, H., Hirasawa, A., Miura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., and Inazawa, J. (2002) *Cancer Res.* **62**, 4860–4866
- Dai, Z., Zhu, W. G., Morrison, C. D., Brena, R. M., Smiraglia, D. J., Raval, A., Wu, Y. Z., Rush, L. J., Ross, P., Molina, J. R., Otterson, G. A., and Plass, C. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 791–801
- Zender, L., Spector, M. S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S. T., Luk, J. M., Wigler, M., Hannon, G. J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S., and Lowe, S. W. (2006) *Cell* **125**, 1253–1267
- Gordon, G. J., Mani, M., Mukhopadhyay, L., Dong, L., Yeap, B. Y., Sugarbaker, D. J., and Bueno, R. (2007) *J. Pathol.* **211**, 439–446
- Tamm, I., Kornblau, S. M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., Scudiero, D. A., Tudor, G., Qui, Y. H., Monks, A., Andreeff, M., and Reed, J. C. (2000) *Clin. Cancer Res.* **6**, 1796–1803
- Kempkensteffen, C., Hinz, S., Christoph, F., Köllermann, J., Krause, H., Schrader, M., Schostak, M., Miller, K., and Weikert, S. (2007) *Int. J. Cancer* **120**, 1081–1086
- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Buben-dorf, L., Kallioniemi, O. P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., Gao, G. J., and Reed, J. C. (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**, 4914–4925
- Ma, O., Cai, W. W., Zender, L., Dayaram, T., Shen, J., Herron, A. J., Lowe, S. W., Man, T. K., Lau, C. C., and Donehower, L. A. (2009) *Cancer Res.* **69**, 2559–2567
- Cheng, L., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Toshkov, I. A., Wang, W., Camps, J., Ried, T., and Nikitin, A. Y. (2010) *Oncogene* **38**, 62–71
- Plenchette, S., Cathelin, S., Rébé, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T. H., Padua, R. A., Dubreix-Daloz, L., and Solary, E. (2004) *Blood* **104**, 2035–2043
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquel, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolonne, N., Chiosio, G., Dubreix-Daloz, L., Solary, E., and Garrido, C. (2008) *Cell Death Differ.* **15**, 859–866
- Samuel, T., Okada, K., Hyer, M., Welsh, K., Zapata, J. M., and Reed, J. C. (2005) *Cancer Res.* **65**, 210–218
- Ponnelle, T., Chapusot, C., Martin, L., Bonithon-Kopp, C., Bouvier, A. M., Plenchette, S., Rageot, D., Faivre, J., Solary, E., and Piard, F. (2003) *Pathol. Res. Pract.* **199**, 723–731
- Vischioni, B., van der Valk, P., Span, S. W., Kruyt, F. A., Rodriguez, J. A., and Giaccone, G. (2006) *Hum. Pathol.* **37**, 78–86
- Tanimoto, T., Tsuda, H., Imazeki, N., Ohno, Y., Imoto, I., Inazawa, J., and Matsubara, O. (2005) *Cancer Lett.* **224**, 141–151
- DeGregori, J., and Johnson, D. G. (2006) *Curr. Mol. Med.* **6**, 739–748
- Dimova, D. K., and Dyson, N. J. (2005) *Oncogene* **24**, 2810–2826
- Blais, A., and Dynlacht, B. D. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 658–662
- Tyagi, S., Chabes, A. L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007) *Mol. Cell* **27**, 107–119
- Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G., and Giordano, A. (2007) *J. Cell Biochem.* **102**, 1400–1404
- Paggetti, J., Largeot, A., Aucagne, R., Jacquel, A., Lagrange, B., Yang, X. J., Solary, E., Bastie, J. N., and Delva, L. (2010) *Oncogene* **29**, 5019–5031
- Mace, P. D., Smits, C., Vaux, D. L., Silke, J., and Day, C. L. (2010) *J. Mol. Biol.* **400**, 8–15
- Geng, Y., Eaton, E. N., Picón, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R. A. (1996) *Oncogene* **12**, 1173–1180
- Conze, D. B., Albert, L., Ferrick, D. A., Goeddel, D. V., Yeh, W. C., Mak, T., and Ashwell, J. D. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 3348–3356
- Kouzarides, T. (2007) *Cell* **128**, 693–705
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W. D., and Chen, J. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 1025–1031
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30830–30835
- Hallstrom, T. C., and Nevins, J. R. (2006) *Genes Dev.* **20**, 613–623
- Chong, J. L., Wenzel, P. L., Sáenz-Robles, M. T., Nair, V., Ferrey, A., Hagan, J. P., Gomez, Y. M., Sharma, N., Chen, H. Z., Ouseph, M., Wang, S. H., Trikha, P., Culp, B., Mezache, L., Winton, D. J., Sansom, O. J., Chen, D., Bremner, R., Cantalupo, P. G., Robinson, M. L., Pipas, J. M., and Leone, G. (2009) *Nature* **462**, 930–934
- Sahin, F., and Sladek, T. L. (2010) *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 116–128
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2008) *Trends Cell Biol.* **18**, 528–535
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., and Korneluk, R. G. (2008) *Oncogene* **27**, 6252–6275
- Srinivasula, S. M., and Ashwell, J. D. (2008) *Mol. Cell* **30**, 123–135
- Gibbs, J. D., Liebermann, D. A., and Hoffman, B. (2008) *Oncogene* **27**, 98–106
- Ivanova, I. A., Nakrieko, K. A., and Dagnino, L. (2009) *Oncogene* **28**, 52–62
- Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H. T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. (2007) *Mol. Cell* **28**, 914–922
- Sutherland, R. L., and Musgrove, E. A. (2004) *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **9**, 95–104

## Legends

**Supplementary Figure 1.** GST pull-down analysis of the interaction of GST-cIAP1 (A, B), GST-cIAP1 mutants (B) or GST-E2F1 (C) with indicated proteins. *A, B*, Cell lysate from untransfected HeLa cells were loaded on GST, GST-cIAP1 or GST-cIAP1 mutants immobilized on glutathione sepharose beads. Interactions were evaluated by immunoblotting. *C*, Cell lysate from HeLa cells transfected with indicated FLAG-constructs was incubated with GST or GST-E2F1 immobilized on glutathione sepharose beads. Interactions were evaluated by cIAP1 immunoblotting. *D*, Endogenous cIAP1 was immunoprecipitated from the cytoplasm (cyto) and nucleus (nuclei)-enriched fractions with anti-cIAP1 or irrelevant goat Ig (IgG) before immunoblot analysis of cIAP1 and TRAF2. MW: molecular weight. *E*, GST pull-down analysis of the competitive interaction of cIAP1 with E2F1 or TRAF2. GST-cIAP1 immobilized on glutathione sepharose beads was incubated in the presence of a constant amount of cells lysate from E2F1-transfected 293T cells and increasing amount of cell lysate from TRAF2-transfected 293T cells. Interactions were evaluated by E2F1 or TRAF2 immunoblotting.

**Supplementary Figure 2.** Gene luciferase experiments performed in HeLa (A) HT-29 (B) and U2-OS (C) cells transfected with CCNE promoter-luciferase reporter plasmid (*pCCNE*), along with indicated constructs. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by empty vector alone. Mean  $\pm$  sd of one representative experiment. Upper panels: the efficiency of cIAP1 expression is checked by immunoblotting.

**Supplementary Figure 3.** Quantitative RT-PCR analysis of *ccne* or *birc2* mRNA in HT-29 cells transfected with empty or cIAP1 encoding vectors. Results normalized to *hprt* mRNA and expressed relative to empty vector. Mean  $\pm$  SD of one representative experiment.

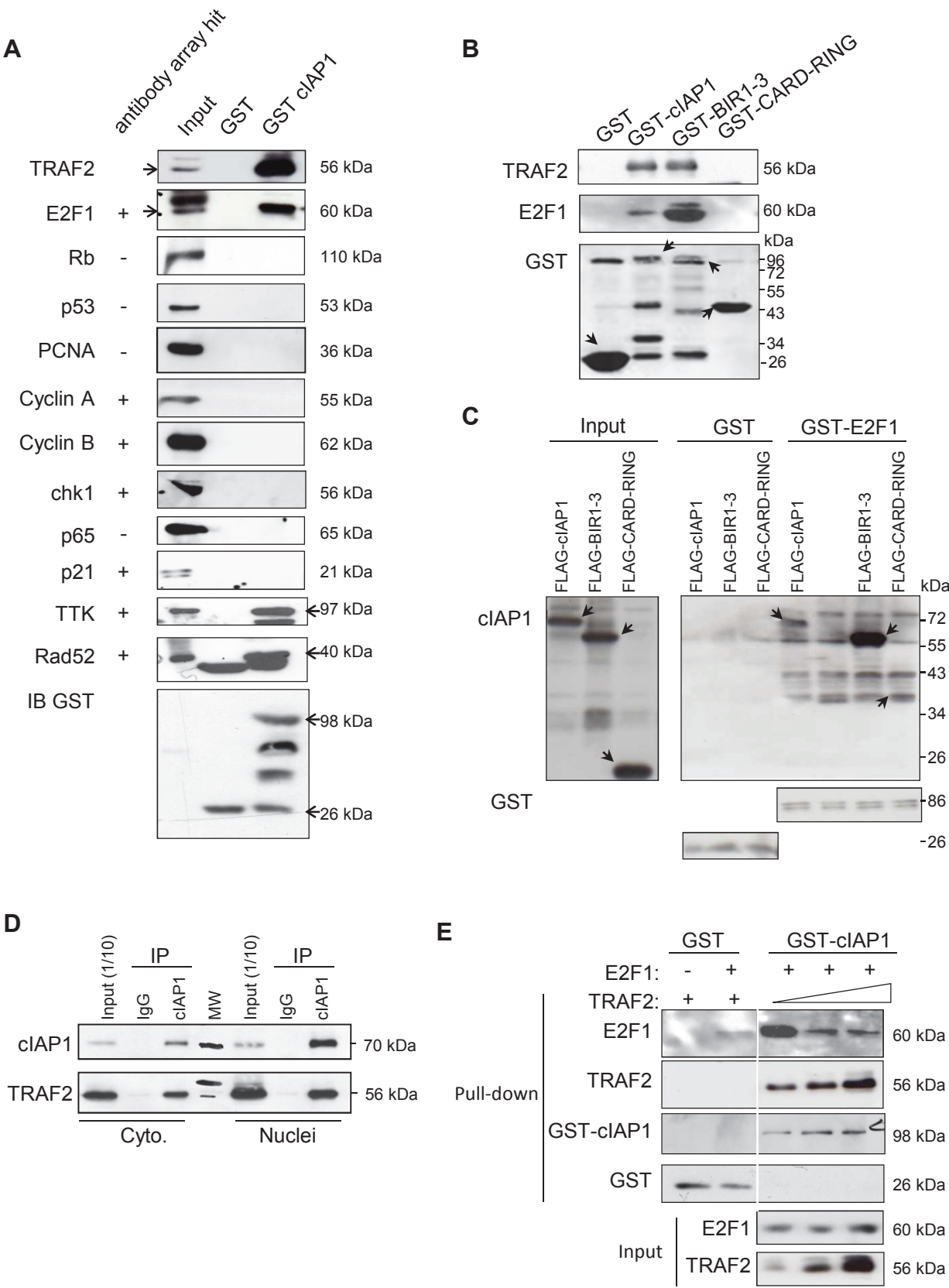
**Supplementary Figure 4.** Flow cytometry analysis of cell cycle repartition in HeLa cell synchronized in late G1 phase by a thymidine double block. Cell cycle is evaluated in asynchronized (As) and in

synchronized cells studied 0, 2, 4, 6 and 8 hours after block release by flow cytometry after BrdU and PI staining of cells.

**Supplementary Figure 5.** Chromatin immunoprecipitation experiments performed using an anti-E2F1, anti-cIAP1 or an irrelevant antibody (Ig) in HeLa (A) or CaSki (B) cells. The genomic DNA region encompassing one E2F-binding site of the *CCNE* (p(*CCNE*) or *CCNA* (p(*CCNA*) promoters were amplified by PCR. *A*, HeLa cell were synchronized in late G1 phase by a thymidine double block and ChIP is performed 0, 2, 4, 6 and 8 hours after block release. *B*, CaSki cells were transfected with control (si-Co) or cIAP1-targetted si-RNA (si-cIAP1) 48 hours before ChIP analysis.

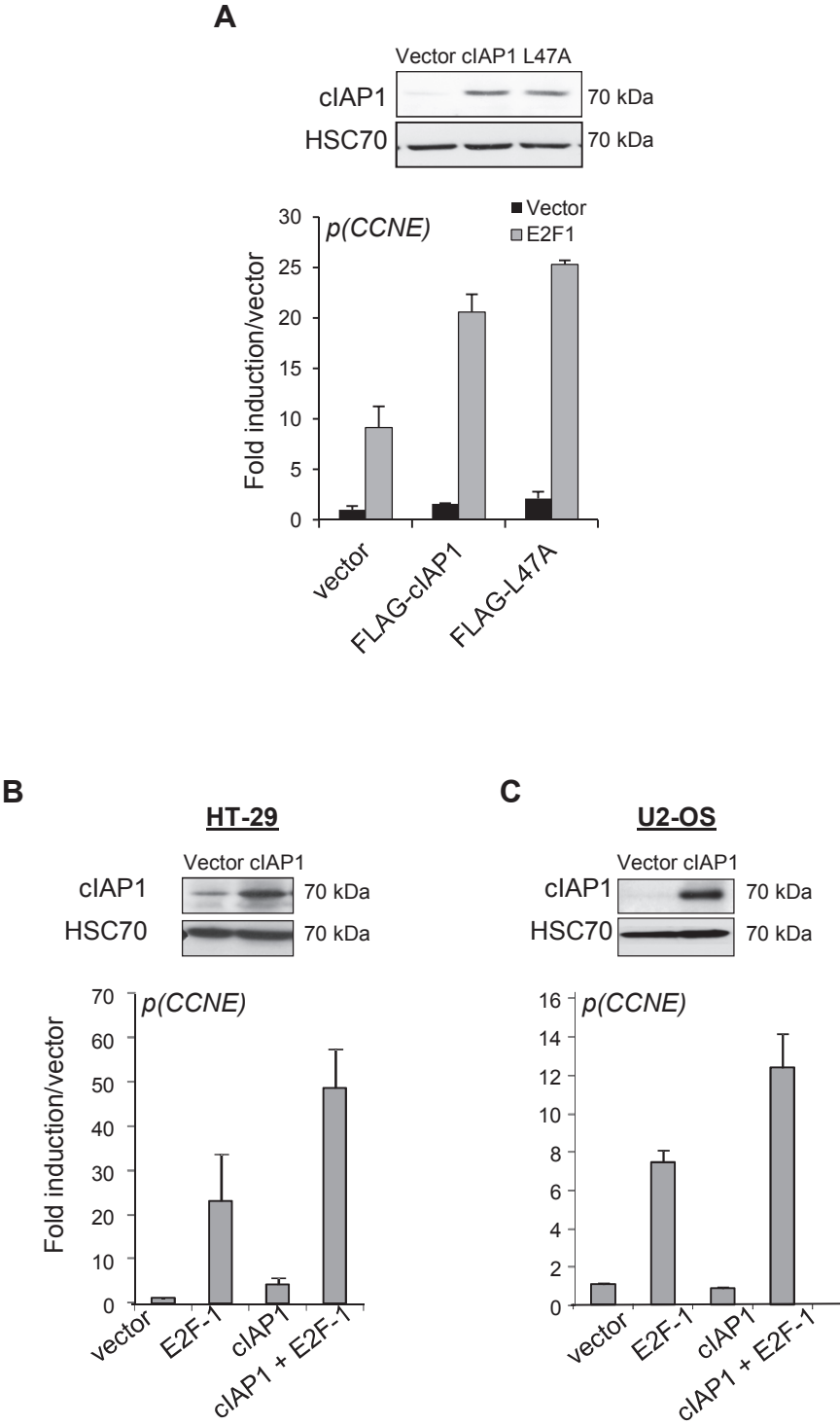
**Supplementary Figure 6.** *A*, Quantitative RT-PCR analysis of *CCNE* mRNA in MEF from wild type (wt) or cIAP1-deleted mice (cIAP1<sup>-/-</sup>). Results normalized to HPRT mRNA and expressed relative to MEF wt. Mean  $\pm$  SD of one representative experiment. *B*, Immunoblot analysis of cIAP1, cyclin E, cyclin A in MEF from wild type (wt) or cIAP1-deleted mice (cIAP1<sup>-/-</sup>). HSC70: loading control. *C*, MEF were stained with Hoechst 33 352 (7.5 $\mu$ g/ml, 1 hour) and then sorted in function of their DNA content. *Upper*, Flow cytometry analysis of DNA content before (As) and after sorting. *Lower*, Immunoblot analysis of cIAP1, XIAP and E2F1 in the cytoplasm (C) and nucleus (N)-enriched fractions of sorted MEF cells. HSC70: loading control. *D*, Gene luciferase experiments performed in MEF cIAP1<sup>-/-</sup> cells transfected with *CCNE* promoter-luciferase reporter plasmids, along with control (Co) or E2F1 and/or cIAP1-encoding vector. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction of promoter stimulated by empty vector alone. Mean  $\pm$  sd of one representative experiment.

# Supplementary Figure 1

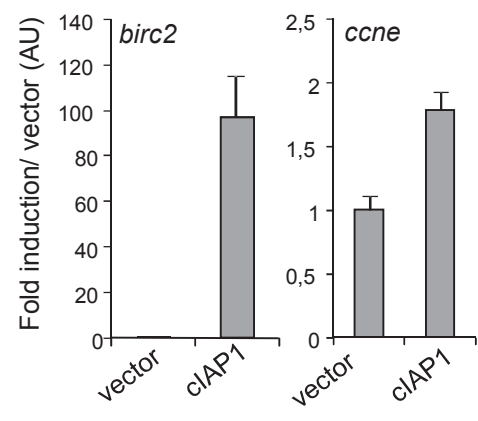




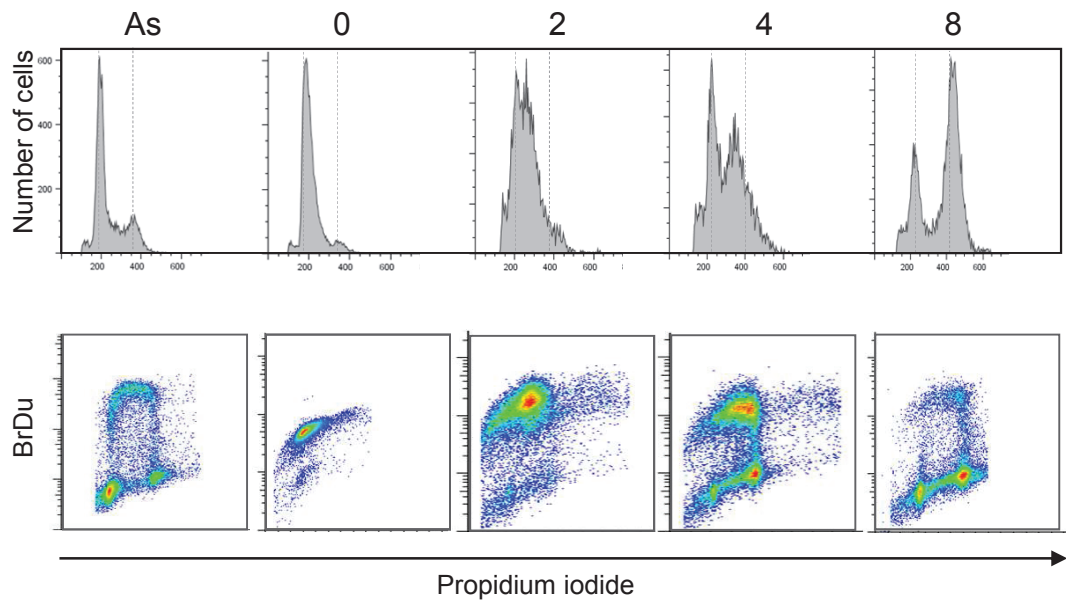
Supplementary Figure 2



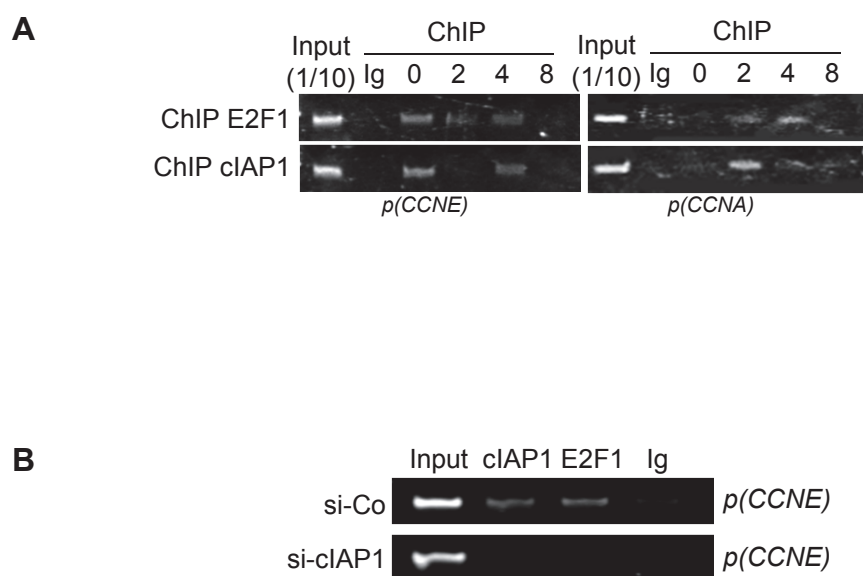
Supplementary Figure 3



## Supplementary Figure 4

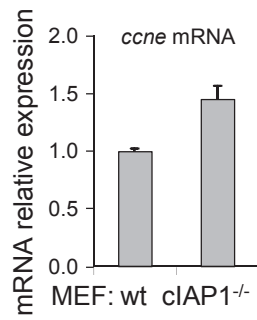


## Supplementary Figure 5

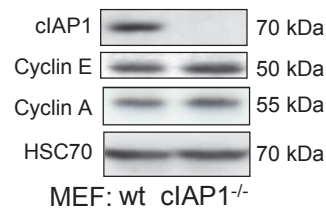


## Supplementary Figure 6

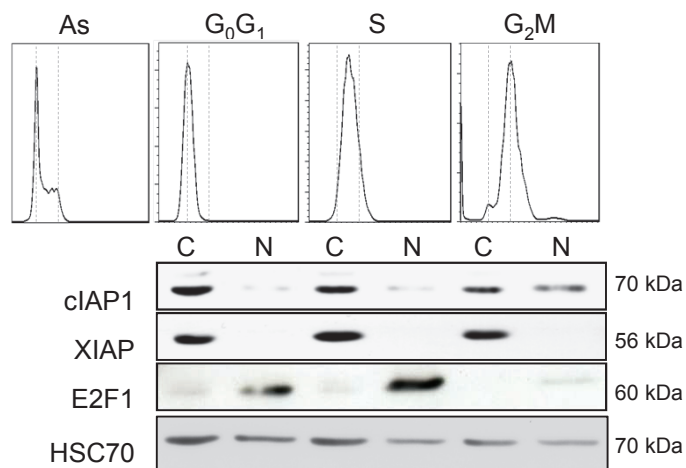
**A**



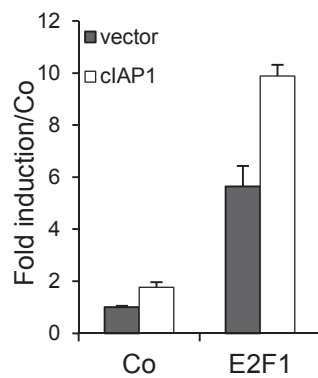
**B**



**C**



**D**

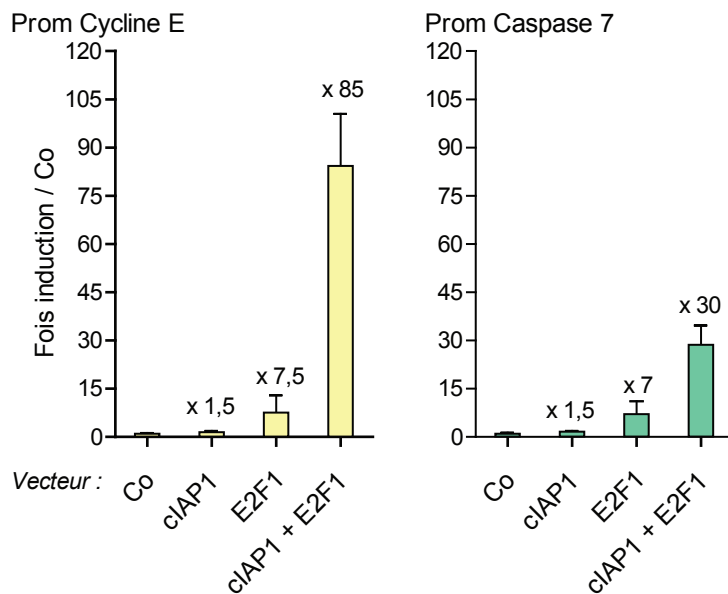


Cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau rôle de cIAP1, un rôle de co-régulateur transcriptionnel.

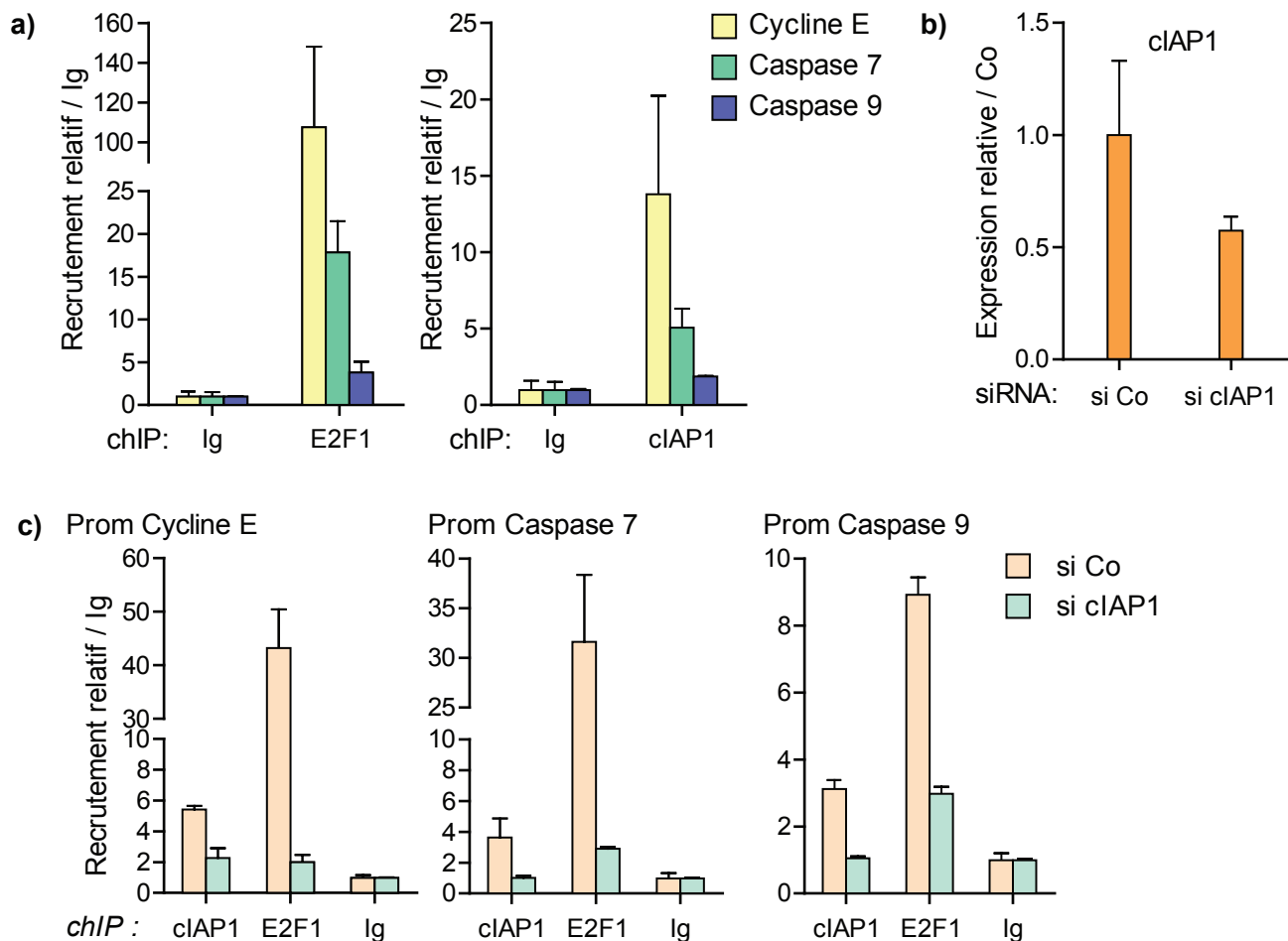
Une étude avait déjà montré un rôle dans la régulation du facteur de transcription Myc par cIAP1, mais il s'agissait d'une action indirecte via la dégradation de Mad1, un inhibiteur de Myc (Xu, Zhu et al. 2007).

Dans cet article, nous avons montré que lorsqu'il est nucléaire, cIAP1 :

- interagit avec E2F1
- est recruté sur les promoteurs des cyclines
- est nécessaire au recrutement de E2F1 sur les promoteurs des cyclines
- contrôle l'activité transcriptionnelle de E2F1
- régule le niveau d'expression des cyclines
- influe sur la prolifération des cellules



**Figure 17 : cIAP1 stimule l'activité transcriptionnelle de E2F1 sur le promoteur de la Caspase-7.** Des cellules de la lignée HeLa ont été co-transfectées avec la construction codant le gène luciférase sous le contrôle du promoteur de la Cycline E ou celui de la Caspase-7 en présence ou non de cIAP1 et E2F1. Après 48 heures, l'activité luciférase est évaluée par luminométrie.



**Figure 18 : Le recrutement de cIAP1 est nécessaire au recrutement de E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E, de la Caspase-7 et de la Caspase-9.** (a) Une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine a été réalisée sur des cellules de la lignée HeLa avec les anticorps anti-E2F1, cIAP1 ou une immunoglobuline contrôle (Ig). L'ADN précipité a été amplifié par PCR quantitative avec des amorces ciblant le promoteur du gène de la Cycline E, de la Caspase-7 et de la Caspase-9. Les résultats sont normalisés par rapport à l'ADN de l'échantillon avant immuno-précipitation et exprimés en recrutement relatif de la protéine immuno-précipitée par rapport à l'Ig contrôle. (b) Les cellules HeLa ont été transfectées avec un siRNA contrôle (si Co) ou un siRNA spécifique de cIAP1 (si cIAP1), après 48 heures, l'efficacité de la transfection a été contrôlée par RT-qPCR. (c) Une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine après la diminution d'expression de cIAP1 a été réalisée comme précédemment sur le promoteur de la Cycline E, Caspase-7, Caspase-9.

## **B) cIAP1 contrôle l'activité de E2F1 sur les promoteurs d'effecteurs de l'apoptose.**

E2F1 a aussi été impliqué dans la régulation de l'apoptose en contrôlant la transcription de nombreuses cibles pro-apoptotiques dont les caspases et APAF-1 (Nahle, Polakoff et al. 2002). Il a, en effet, été montré que la protéine adénovirale E1A qui inactive Rb va permettre une activation de E2F1 et entraîne l'accumulation de pro-caspase-3, -7, -8 et -9 par un mécanisme transcriptionnel direct, dépendant de E2F1.

Nous avons alors étudié l'influence de cIAP1 sur la transcription des caspases-7 et -9.

### **1. cIAP1 stimule l'activité de E2F1 sur le promoteur de la caspase-7.**

L'influence de cIAP1 sur l'activité du facteur de transcription E2F1 a été évaluée par un test de gène rapporteur sur le promoteur de la caspase-7 comparé à celui de la Cycline E (*Figure 17*). cIAP1 seul active très faiblement l'expression de la luciférase mais il stimule fortement l'activité du facteur de transcription sur le promoteur de la Cycline E mais aussi sur le promoteur de la caspase-7. L'effet de cIAP1 est cependant beaucoup plus fort sur le promoteur de la Cycline E par rapport au promoteur de la caspase-7.

### **2. cIAP1 est recruté sur les promoteurs des caspases-7 et -9 et il est nécessaire au recrutement de E2F1.**

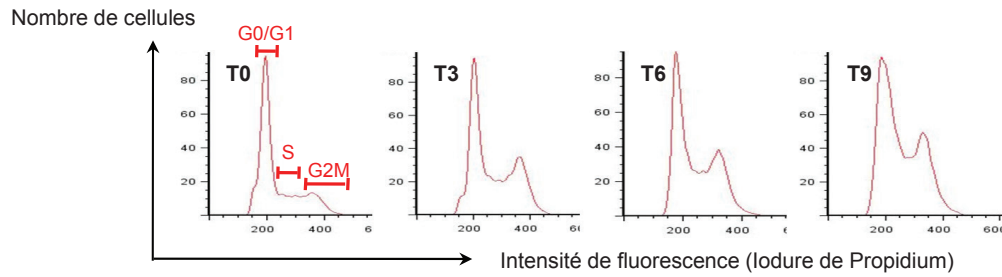
Nous avons étudié la capacité de cIAP1 à se fixer sur les promoteurs des caspases-7 et -9 en utilisant une technique d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP). Le recrutement sur le promoteur de la Cycline E est utilisé comme contrôle positif de recrutement de cIAP1.

Comme attendu, E2F1 se fixe sur le promoteur de ces cibles (*Figure 18a*). Cependant, nous observons une fixation faible (x 4) du facteur de transcription sur le promoteur de la caspase-9 comparé aux autres promoteurs.

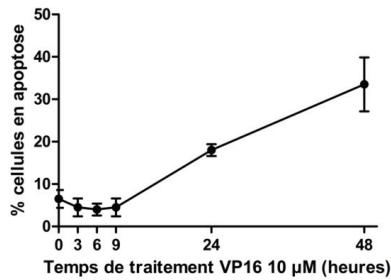
Nous confirmons la capacité de cIAP1 à se fixer sur le promoteur de la Cycline E. cIAP1 est aussi capable de lier significativement le promoteur de la caspase-7. Par contre, le recrutement de cIAP1 sur le promoteur de la caspase-9 ne semble pas significatif. De façon très intéressante, nous avons observé un profil d'interaction identique du facteur de transcription E2F1 et de la protéine cIAP1 sur les promoteurs de ces cibles. Nous avons alors voulu étudier l'importance de cIAP1 dans le recrutement du facteur de transcription E2F1 sur les promoteurs cibles. L'expression de cIAP1 a été diminuée par interférence ARN (*Figure 18b*) avant immuno-précipitation de cIAP1 ou de E2F1. Un siRNA ciblant cIAP1 abolit complètement le recrutement de cIAP1 sur les promoteurs et inhibe fortement le recrutement de E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E, caspase-7, et caspase-9 (*Figure 18c*). Ces résultats suggèrent que cIAP1 est nécessaire au recrutement du facteur de transcription E2F1 sur les promoteurs étudiés.



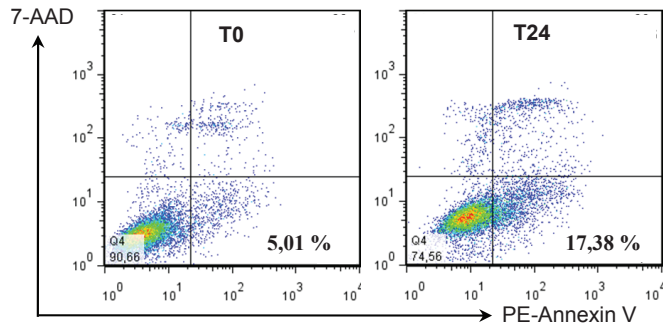
a)



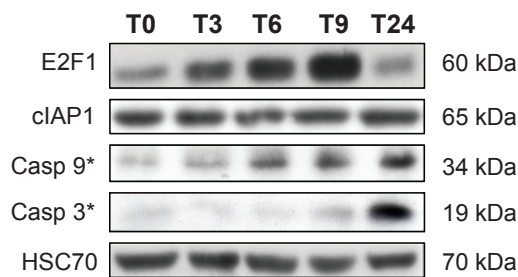
b)



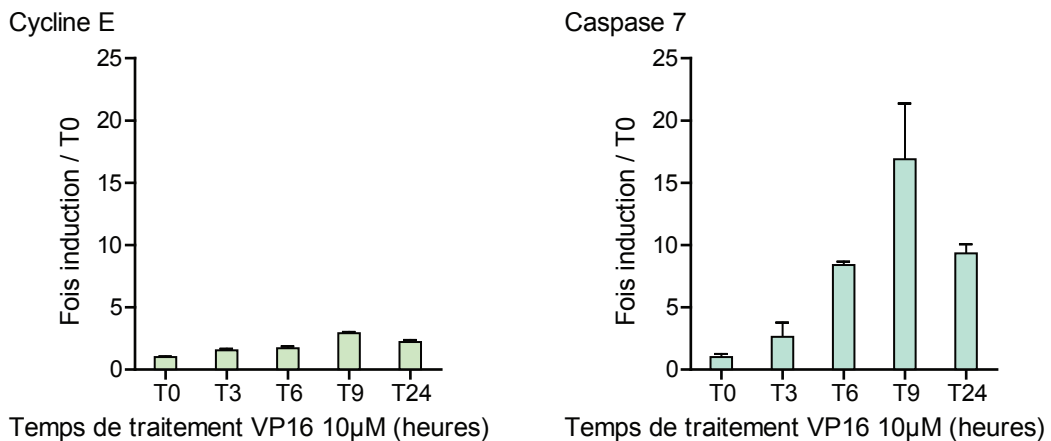
c)



d)



e)



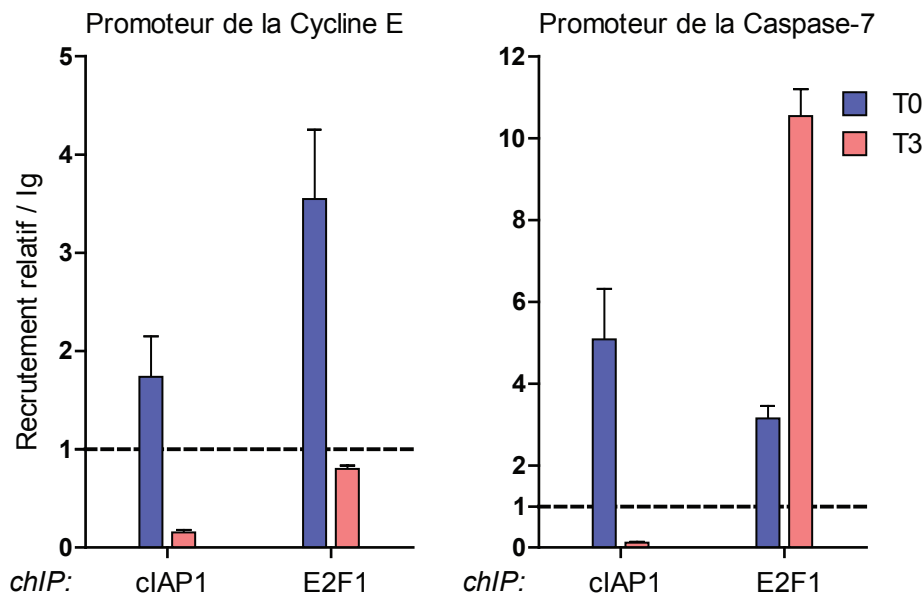
**Figure 19 : Mise en place d'un modèle d'induction de l'apoptose.** Les cellules sont traitées avec de l'étoposide à la concentration de 10 μM. **(a)** L'effet sur le cycle cellulaire a été contrôlé en cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. **(b)** Le nombre de cellules en apoptose est contrôlé par comptage microscopique après coloration de l'ADN à l'Hoeschst 33352 ou **(c)** par cytométrie en flux après un marquage des phosphatidyl-sérines avec de l'Annexin V-PE et marquage de l'ADN avec le 7-AAD à différents temps : T0, T3, T6, T9, T24 heures de traitement. **(d)** La quantité de E2F1, cIAP1, Caspase-9, Caspase-9 activée (Casp 9 \*) et de Caspase-3 activée (Casp 3\*) a été contrôlée par immuno-empreinte. HSC70 a été utilisé comme contrôle de charge. **(e)** Le taux de transcription de la Cycline E et de la Caspase-7 a été mesuré par RT-qPCR

### 3. Variation du recrutement de cIAP1 et E2F1 sur les promoteurs de la cycline E et de la caspase-7 en réponse au traitement à l'étoposide.

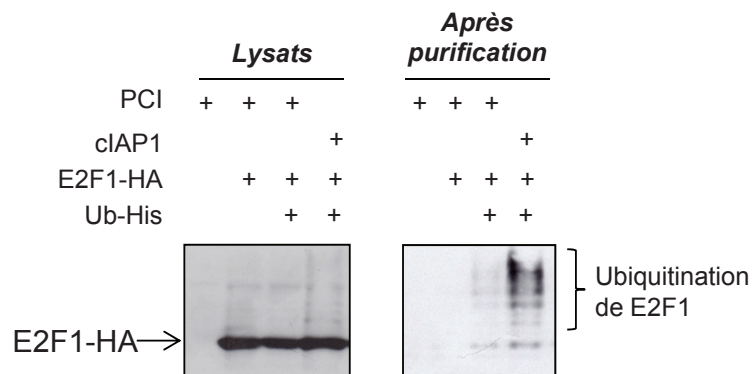
Nous avons choisi l'étoposide (ou VP16) comme inducteur d'apoptose. En effet, l'apoptose induite par l'étoposide est accompagnée d'une stabilisation de E2F1 et de l'augmentation de son activité. Dans ces conditions, E2F1 est un régulateur de l'apoptose (Lin, Lin et al. 2001). L'étoposide est un agent cytotoxique couramment utilisé en clinique humaine comme molécule anticancéreuse. L'étoposide induit des cassures doubles brins de l'ADN grâce à sa capacité à inhiber la topoisomérase II. Ces lésions conduisent à un arrêt des cellules dans le cycle cellulaire puis à leur apoptose. Un traitement à 10  $\mu$ M d'étoposide induit rapidement (dès 3 heures) et progressivement une accumulation des cellules HeLa en phases S et G2/M (*Figure 19a*). L'apoptose est caractérisée par une analyse morphologique des cellules présentant une condensation de la chromatine (*Figure 19b*), par la détection en cytométrie en flux de la présence de phosphatidyl-sérines à la surface des cellules (*Figure 19c*) et par la détection des fragments actifs des caspases-9 et -3 en immuno-empreinte (*Figure 19d*). Le pourcentage de cellules en apoptose atteint 20% après 24 heures de traitement et 30% après 48 heures (*Figure 19b*). Les fragments actifs de la caspase-9 apparaissent après 6 heures de traitement et ceux de la caspase-3 après 9 heures de traitement. L'expression de cIAP1 ne change pas mais nous observons une accumulation progressive de E2F1 jusqu'à 9 heures de traitement puis son expression diminue. De la même façon, le niveau d'ARN messagers des cibles Cycline E et caspase-7 augmente aussi progressivement jusqu'à 9 heures de traitement puis diminue (*Figure 19e*). L'induction de la caspase-7 est cependant beaucoup plus forte que celle de la Cycline E.

Nous avons étudié le recrutement de cIAP1 et de E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E et de la caspase-7 après 3 heures de traitement par l'étoposide.

Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine montrent tout d'abord une diminution du recrutement de E2F1 et de cIAP1 sur le promoteur de la Cycline E après 3 heures de traitement (*Figure 20*). Par contre, on observe une augmentation de la fixation de E2F1 sur le promoteur de la caspase-7 alors que l'on perd complètement le recrutement de cIAP1. Ce résultat est particulièrement étonnant puisque l'utilisation de siRNA nous a précédemment démontré la nécessité de cIAP1 pour permettre le recrutement de E2F1. Il semble donc que selon le contexte cellulaire, les mécanismes mis en jeu dans la régulation de E2F1 par cIAP1 peuvent varier mais également en fonction que les cibles soient pro-apoptotique ou pro-prolifération.



**Figure 20 : Recrutement de cIAP1 et E2F1 sur les promoteurs de la Cycline E et de la Caspase-7 après 3 heures de traitement à l'étoposide.** Les cellules de la lignée HeLa ont été traitées pendant 0 et 3 heures avec 10  $\mu$ M d'étoposide (T0, T3), puis une immuno-précipitation de la chromatine a été effectuée. Les anticorps utilisés étaient anti-cIAP1, E2F1 ou une immunoglobuline contrôle (Ig). L'ADN précipité a été amplifié par PCR quantitative avec des amorces ciblant le promoteur du gène de la Cycline E ou de la Caspase-7. Les résultats sont normalisés par rapport à l'ADN de l'échantillon avant immuno-précipitation et exprimés en recrutement relatif de la protéine immuno-précipitée par rapport à l'Ig contrôle.



**Figure 21 : E2F1 est une cible d'ubiquitination de cIAP1.** Des cellules de la lignée HEK293T sont transfectées avec trois constructions codant de l'ubiquitine conjuguée à l'histidine (His-Ub), cIAP1 et E2F1 fusionnée à l'étiquette HA (E2F1-HA). Les lysats de ces cellules sont analysés par immuno-empreinte avec un anticorps anti-HA (panel gauche). Les lysats de ces cellules ont été mis en contact avec des billes sépharose-cobalt (panel droit). Les protéines immobilisées par les billes sont ensuite éluées puis analysées par immuno-empreinte en utilisant un anticorps anti-HA.

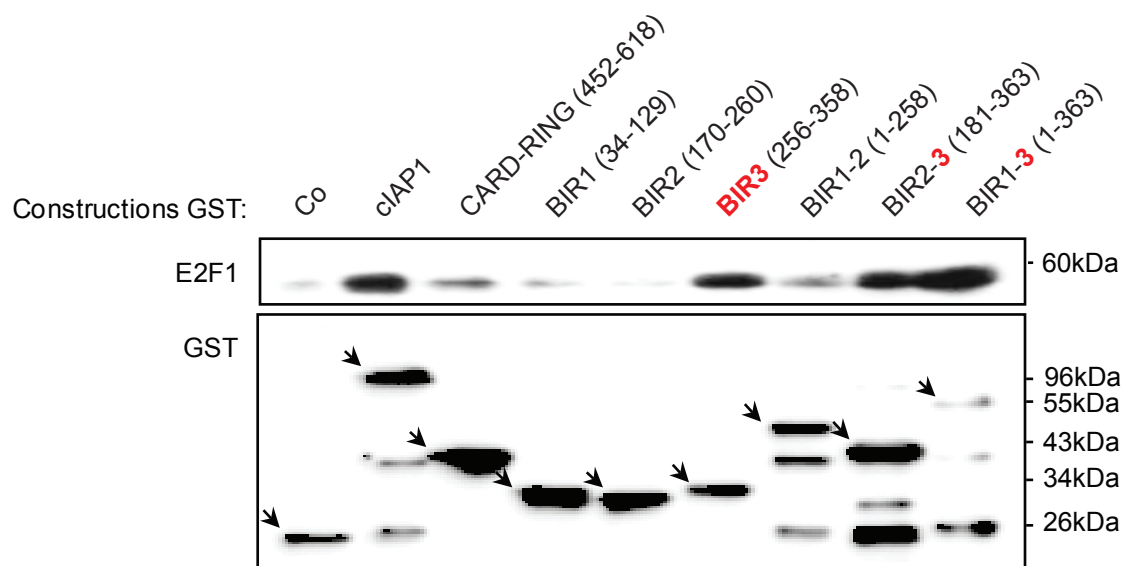
### **C) Analyse des mécanismes de régulation de E2F1 par cIAP1.**

Le facteur de transcription E2F1 est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, la neddylation et l'ubiquitination (Putzer and Engelmann 2013). Ces modifications vont alors modifier son activité, son profil de cibles transcriptionnelles mais également modifier son interaction avec ses cofacteurs. cIAP1 étant une protéine à activité E3-ubiquitine ligase, nous nous sommes intéressés à cette modification. L'ubiquitination de E2F1 a déjà été démontrée. Elle permet la dégradation de la protéine par le système du protéasome en fin de phase S du cycle cellulaire. Des ubiquitinations non dégradatives ont aussi été décrites (Zhang, Wang et al. 2005, Wong, Dong et al. 2011).

Une accumulation de E2F1 conjugué à des chaînes d'ubiquitine K11 a été montrée en réponse à des endommagements de l'ADN. Cette ubiquitination est médiée par APC/C et n'entraîne pas la dégradation de E2F1 dans ce contexte (Budhavarapu, White et al. 2012).

Nous avons alors voulu déterminer si E2F1 est une cible d'ubiquitination de cIAP1. Nous avons donc réalisé un test d'ubiquitination *in vitro* de E2F1 par cIAP1 (*Figure 21*). Ce test a été mené dans des cellules HEK293T. Les cellules ont été transfectées avec E2F1, un vecteur codant l'ubiquitine conjuguée à l'étiquette histidine, en présence ou non de cIAP1. Les protéines ubiquitinées ont ensuite été immobilisées sur des billes sépharose-cobalt. L'ubiquitination de E2F1 a été révélée par immuno-empreinte. Une surexpression de cIAP1 augmente de façon significative le niveau d'ubiquitination de E2F1 suggérant que E2F1 est une cible d'ubiquitination de cIAP1. Cependant, des expériences utilisant un mutant de cIAP1 ayant perdu son activité E3-ubiquitine ligase (le mutant H588A) (*Article 1, Figure 2B, 2D*) montrent que ce mutant conserve sa capacité à activer E2F1 ce qui exclue le rôle de l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1 dans cette régulation. Cette hypothèse a donc été temporairement abandonnée.

Ce travail a été repris dernièrement par une chercheuse post-doctorante, Valérie Glorian qui a montré l'importance de l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1 dans son activité co-régulatrice de E2F1 dans des cellules dépourvues de cIAP1. Il est aujourd'hui établi que les IAP agissent sous forme de dimères. Nous avons nous-mêmes montré la présence de ces dimères par immuno-précipitation en utilisant des protéines cIAP1 taguées. Dans des cellules exprimant cIAP1, le mutant H588A permet le recrutement de la protéine cIAP1 endogène à activité E3-ubiquitine ligase. Valérie Glorian a aussi confirmé la capacité de cIAP1 à induire l'ubiquitination de E2F1. La caractérisation de cette ubiquitination (nature des chaînes d'ubiquitine et lysines impliquées) est en cours. Ces résultats montrent que cette ubiquitination de E2F1 permet une stabilisation de la protéine.



**Figure 22: E2F1 interagit avec le domaine BIR3 de cIAP1.** Expérience de GST-pull down. Différentes protéines de fusion contenant la protéine cIAP1 entière ou des domaines isolés de cIAP1 ont été immobilisées sur des billes glutathion-sépharose puis incubées en présence de la protéine recombinante E2F1-HA. L'interaction a été révélée par immuno-empreinte. On observe une interaction de E2F1 avec le domaine BIR3 de cIAP1 et avec tous les autres fragments contenant ce domaine. Les flèches indiquent les bandes correspondantes aux protéines de fusion GST.

#### **D) Recherche des sites d'interaction cIAP1 - E2F1.**

Nous avons montré (*Article 1, Figure 1F, 1G*) que cIAP1 interagissait via ses domaines BIR avec la région contenant le domaine de liaison à l'ADN de E2F1. Nous avons entrepris une caractérisation plus fine de la région d'interaction de cIAP1 afin de construire un mutant de cIAP1 incapable d'interagir avec E2F1.

Des études de GST-pull down avec des constructions contenant des domaines isolés de cIAP1 ont révélé que l'interaction se faisait via le domaine BIR3 de cIAP1 (*Figure 22*).

Ce travail a été poursuivi par Jennifer Allègre durant son master et sa première année de thèse. Elle a montré l'importance d'une région de treize acide-aminés (267-279) correspondant à la première hélice alpha du domaine BIR3. Des expériences de mutagenèse dirigée sont en cours afin d'identifier précisément le site d'interaction mis en jeu. Un mutant délété de ce domaine (cIAP1 $\Delta$  $\alpha$ 1BIR3) a été construit. Ce mutant perd sa capacité à lier et à activer E2F1 mais conserve sa capacité à lier l'adaptateur moléculaire TRAF2 et la protéine cdc42.

#### **E) Conclusion**

Ce travail, réalisé durant mon année de master et ma première année de thèse a permis de montrer une régulation différentielle du facteur de transcription E2F1 par cIAP1 en fonction de la cible étudiée. Lors de la prolifération cellulaire, cIAP1 permet la fixation du facteur de transcription sur le promoteur des cyclines E et A et des caspases-7 et -9. cIAP1 stimulerait la transcription de régulateurs du cycle cellulaire tandis qu'elle inhiberait la transcription de régulateurs de l'apoptose. Lors de l'apoptose, une perte du recrutement de cIAP1 pourrait favoriser la transcription de régulateurs de l'apoptose. Les mécanismes impliqués ne sont, cependant, pas encore identifiés mais nous avons mis en évidence la capacité de cIAP1 à ubiquitiner E2F1.

Ces travaux sont particulièrement intéressants quand on voit l'émergence de l'importance des co-facteurs transcriptionnels sur la régulation de E2F1. Selon le partenaire impliqué, les fonctions de E2F1 peuvent changer drastiquement, pouvant passer d'un facteur de transcription activateur à un facteur de transcription répresseur.

### III) Analyse de l'interaction de cIAP1 avec les GTPases de la famille Rho.

Les RhoGTPases sont des petites protéines très finement régulées qui vont influencer la réponse des cellules à de nombreux stimuli (*Introduction, F*). Elles sont particulièrement décrites dans leur rôle sur la régulation du réseau d'actine et du cytosquelette des cellules. Nous avons montré une interaction de cIAP1 avec l'une d'entre-elles : cdc42.

#### **A) Rôle de cIAP1 sur le remodelage du réseau d'actine et la régulation de cdc42.**

Article 2

« cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation »

Oncogene, Novembre 2013

Le TNF- $\alpha$  a largement été étudié pour la régulation de la survie ou de la mort cellulaire. Cependant, le TNF- $\alpha$  demeure un médiateur central de l'immunité. Il joue ainsi un rôle très important dans l'activation des macrophages en induisant la sécrétion de cytokines via l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPK. Il a également été montré que le TNF- $\alpha$  stimule un réarrangement du cytosquelette d'actine, favorisant la migration et le recrutement des cellules vers les sites infectieux (Mathew, Haubert et al. 2009).

Une étude réalisée chez la drosophile a montré un rôle des IAP dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et de la migration cellulaire (Geisbrecht and Montell 2004) via une interaction avec les petites protéines G de la famille Rho. Etant donné l'importance de cIAP1 dans la régulation de la signalisation du TNF- $\alpha$ , nous nous sommes intéressés à la capacité de cIAP1 à contrôler l'activation des Rho GTPases et le remodelage de l'actine en réponse à une stimulation par le TNF- $\alpha$ .

Ce travail a été initié par Arthur Marivin (thèse 2009-2012).

Nous avons étudié l'interaction de cIAP1 avec les Rho-GTPases les mieux caractérisées : RhoA, Rac1 et cdc42 (*Article 2, Figure 3*). Nous avons montré que cIAP1 interagit *in vitro* et *in vivo* avec cdc42 mais également avec RhoA et Rac1 avec cependant une affinité plus faible.

L'analyse morphologique des MEF cIAP1<sup>-/-</sup> montre une morphologie très allongée des cellules avec la présence de fines extensions cytoplasmiques de type filipodes, dépendant de cdc42. La formation de ces filipodes est inhibée par la restauration de l'expression de cIAP1 ou d'un mutant de cIAP1 incapable de lier TRAF2 ou incapable d'activité E3-ubiquitine ligase (*Article*

2, Figure 1, b, c). Nous avons montré un contenu en protéines Rho, particulièrement en cdc42, très altéré avec une faible expression de cdc42 mais avec la présence d'une forte proportion de forme activée. cIAP1, avec TRAF2 sont intégrés dans un complexe cytoplasmique contenant cdc42 et RhoGDI. Nous avons montré que cIAP1 stabilisait l'association de cdc42 avec son chaperon moléculaire (Article 2, Figure 2).

Cependant, une délétion de cIAP1 par une stratégie d'interférence ARN ou son absence par l'utilisation de fibroblastes de souris déficientes en cIAP1 inhibe complètement la formation de filipodes (Article 2, Figure 4 & 5) et l'activation de cdc42 en réponse au TNF- $\alpha$  (Article 2, Figure 4c). TRAF2 est aussi indispensable à la formation de filipodes induite par le TNF- $\alpha$  alors que RIP1 et l'activité E3-ubiquitine ligase de cIAP1 ne semblent pas nécessaires (Article 2, Figure 5, e). Le traitement au TNF- $\alpha$  diminue l'interaction de cIAP1 et TRAF2 avec cdc42. Nous avons proposé un modèle dans lequel le recrutement de cIAP1, via TRAF2, sur le récepteur TNFR1 suite à la liaison du TNF- $\alpha$ , libère cdc42 permettant son activation contrôlée.

Nous avons montré que cIAP1 était aussi nécessaire à l'activation de cdc42 et à la formation de filipodes suite à un traitement par l'EGF (Article 2, Figure 6 ; Figure S7). Dans ces conditions, TRAF2 n'est pas nécessaire. Ces résultats suggèrent une régulation générale de cdc42 par cIAP1. Cdc42 est nécessaire à la polarisation des cellules vers le front de migration. Nous avons donc vérifié si cIAP1 avait une influence sur ces phénomènes et montré que les cellules dépourvues de cIAP1 ont un défaut de polarisation, visualisé par l'orientation de l'appareil de Golgi (Article 2, Figure 7a, 7b).

cdc42 est aussi un important intermédiaire dans les voies de signalisation conduisant à la transformation oncogénique médiée par l'oncogène HRasV12 (Stengel and Zheng 2012). En effet, une perte d'expression ou de fonction de cdc42 dans des cellules transformées par HRasV12 entraîne une diminution de la croissance des cellules en milieu semi-solide, de la prolifération, de la progression des cellules dans le cycle cellulaire ainsi que de la tumorigénicité des cellules. J'ai donc développé un modèle d'étude permettant de déterminer le rôle de cIAP1 dans ces phénomènes. J'ai alors surexprimé HRasV12 dans des fibroblastes de souris sauvages ou déficientes en cIAP1 par une stratégie rétrovirale. L'absence de cIAP1 diminue la capacité de HRasV12 à activer cdc42, à stimuler la formation de colonies dans un milieu semi-solide et ralentit la croissance tumorale lorsque ces cellules sont injectées par voie sous-cutanée ou intraveineuse (Article 2, Figure 7 b-e ; Figure S8). Un article récent (Reymond, Im et al. 2012) a montré que cdc42 contrôlait la capacité des cellules à adhérer sur un tapis de cellules endothéliales et à s'insérer dans une monocouche de cellules endothéliales. L'utilisation des lignées MEF-HRas ou l'extinction de cIAP1 dans des cellules PC3 par siRNA montre que cIAP1 est aussi un régulateur de ces phénomènes (Article 2, Figure 7f, 7g ; Figure S9).



## ORIGINAL ARTICLE

## cIAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation

A Marivin<sup>1,2,9</sup>, J Berthelet<sup>1,2,9</sup>, J Cartier<sup>1,2</sup>, C Paul<sup>2,3</sup>, S Gemble<sup>1,2</sup>, A Morizot<sup>4</sup>, W Boireau<sup>5</sup>, M Saleh<sup>4</sup>, J Bertoglio<sup>6,7</sup>, E Solary<sup>7,8</sup> and L Dubrez<sup>1,2</sup>

Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF) is a cytokine endowed with multiple functions, depending on the cellular and environmental context. TNF receptor engagement induces the formation of a multimolecular complex including the TNFR-associated factor TRAF2, the receptor-interaction protein kinase RIP1 and the cellular inhibitor of apoptosis cIAP1, the latter being essential for NF- $\kappa$ B activation. Here, we show that cIAP1 also regulates TNF-induced actin cytoskeleton reorganization through a cdc42-dependent, NF- $\kappa$ B-independent pathway. Deletion of cIAP1 prevents TNF-induced filopodia and cdc42 activation. The expression of cIAP1 or its E3-ubiquitin ligase-defective mutant restores the ability of cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs to produce filopodia, whereas a cIAP1 mutant unable to bind TRAF2 does not. Accordingly, the silencing of TRAF2 inhibits TNF-mediated filopodia formation, whereas silencing of RIP1 does not. cIAP1 directly binds cdc42 and promotes its RhoGDI $\alpha$ -mediated stabilization. TNF decreases cIAP1-cdc42 interaction, suggesting that TNF-induced recruitment of cIAP1/TRAF2 to the receptor releases cdc42, which in turn triggers actin remodeling. cIAP1 also regulates cdc42 activation in response to EGF and HRas-V12 expression. A downregulation of cIAP1 altered the cell polarization, the cell adhesion to endothelial cells and cell intercalation, which are cdc42-dependent processes. Finally, we demonstrated that the deletion of cIAP1 regulated the HRas-V12-mediated transformation process, including anchorage-dependent cell growth, tumour growth in a xenograft model and the development of experimental metastasis in the lung.

*Oncogene* advance online publication, 25 November 2013; doi:10.1038/onc.2013.499

**Keywords:** IAPs; TNF; RhoGTPases; cdc42; metastasis; Ras

## INTRODUCTION

Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF) is a mediator of immune and inflammatory response produced by activated monocytes and macrophages. This cytokine promotes cell proliferation, cell differentiation, cytokine secretion and cell death, depending on the cellular and environmental context.<sup>1</sup> TNF also affects cell shape and cell movement, which may contribute to the recruitment of fibroblasts or neutrophils to the site of tissue injury.<sup>2</sup> Such morphogenetic modifications involve a dynamic rearrangement of the actin cytoskeleton controlled by small GTPases of the Rho family, which includes rhoA, rac1 and cdc42. For example, in endothelial cells, TNF induces the sequential activation of rac1, rhoA and cdc42, which leads to the formation of stress fibers and to cell contraction.<sup>2,3</sup> In fibroblasts and macrophages, TNF triggers the activation of cdc42, which is responsible for the transient formation of the actin-rich protrusions known as filopodia.<sup>2,4,5</sup> Rho GTPases act as molecular switches that transduce the signal from membrane receptors to downstream effectors by shuttling between a GTP-bound active state and a GDP-bound inactive state. Once activated, they are either rapidly recycled into the inactive form or degraded by the ubiquitin-proteasome machinery. The Rho GTPase activation cycle is controlled by guanine-nucleotide exchange factors (GEFs), which catalyse the transfer of GDP-bound forms into GTP-bound forms, by GTPase-activation proteins (GAPs), which inactivate Rho

GTPases by hydrolysing the GTP, and by guanine-nucleotide dissociation inhibitors (GDIs), which are chaperones that stabilize Rho GTPases in a cytosolic inactive state.<sup>2,6,7</sup>

TNF binds two related membrane surface receptors. TNFR1, whose expression is ubiquitous, mediates most of the biological effects of the cytokine, whereas TNFR2 expression is restricted mostly to lymphocytes and endothelial cells. Upon ligand stimulation, TNFR1 recruits, in a membrane-associated complex, the cytosolic adaptor TNFR1-associated death domain protein (TRADD), the TNFR-associated factors (TRAFs), the receptor-interaction protein kinase 1 (RIPK1) and the cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs).<sup>8–11</sup> This molecular platform activates ubiquitin-dependent signaling pathways, resulting in the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) activations and the expression of genes encoding for cytokines, adhesion molecules, survival and differentiation factors.<sup>11–13</sup> In the absence of cIAPs or when the NF- $\kappa$ B signaling is blocked, secondary cytoplasmic complexes leading to cell death are generated from the first one.<sup>14–17</sup>

cIAPs, including cIAP1 and cIAP2, are E3-ubiquitin ligases formed as a result of the presence of a C-terminal RING domain. In addition to the RING, they own three baculovirus IAP repeat (BIR) domains mediating protein–protein interactions, a ubiquitin-binding-associated (UBA) domain that allows the recruitment of

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR866, Faculty of Medicine, Dijon, France; <sup>2</sup>Université de Bourgogne; Institut Fédératif de Recherche (IFR) 100, Dijon, France; <sup>3</sup>Ecole Pratique des hautes études (EPHE), Dijon, France; <sup>4</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; <sup>5</sup>Institut FEMTO-ST, Université de Franche-Comté, CLIPP, Besançon, France; <sup>6</sup>Inserm UMR749, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France; <sup>7</sup>Institut Gustave Roussy, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France and <sup>8</sup>UMR1009, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France. Correspondence: Dr L Dubrez, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR866, Faculty of Medicine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon cedex, France.

E-mail: ldubrez@u-bourgogne.fr

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 5 April 2013; revised 20 September 2013; accepted 21 October 2013

cIAPs into protein complexes<sup>18</sup> and a caspase recruitment domain (CARD) that regulates the E3 activity of the RING domain.<sup>19</sup> Numerous ubiquitination targets and/or partners of cIAP1 have been identified, including signaling molecules, regulators of NF- $\kappa$ B activating pathways<sup>20</sup> and transcriptional regulators such as Mad1<sup>21</sup> and E2F1.<sup>22</sup> In the TNFR1 signaling pathway, cIAP1 promotes its own ubiquitination and the ubiquitination of the kinase RIP1 required for the activation and survival of NF- $\kappa$ B, whereas it inhibits the formation of the RIP1-containing secondary intracellular platforms that trigger cell death.<sup>9,11,12,14–16</sup> cIAP1 is also a potent inhibitor of the alternative NF- $\kappa$ B activating pathway through ubiquitination leading to degradation of NIK.<sup>23,24</sup>

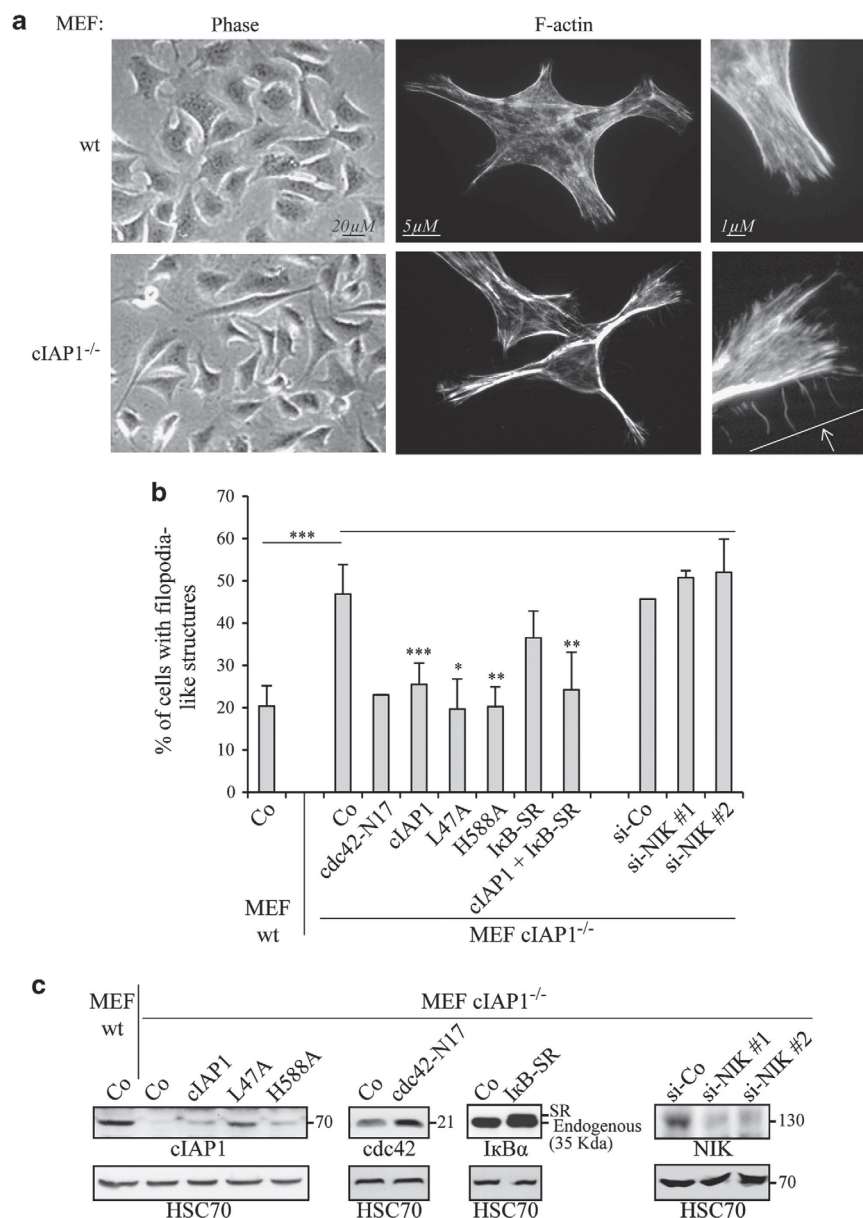
The present study demonstrates that cIAP1 also regulates filopodia formation in response to TNF, EGF and oncogenic HRas-V12 expression. cIAP1 directly interacts with cdc42 and regulates

its activity by promoting its RhoGDI-mediated stabilization. We show that TNF stimulation disrupts the cIAP1/cdc42 interaction and facilitates cdc42-mediated actin rearrangement, independently of NF- $\kappa$ B activation. A downregulation of cIAP1 affected cdc42-regulated processes including cell polarization, cell adhesion, cell intercalation and HRas-V12-mediated cell transformation.

## RESULTS

### Deletion of cIAP1 alters actin cytoskeleton organization.

A previous work from Oberoi *et al.*<sup>25</sup> demonstrated that murine embryonic fibroblasts (MEFs) from *birc2*-deficient mice (cIAP1<sup>-/-</sup>) displayed an altered morphology when compared with their wild-type counterparts. Accordingly, serum-starved cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs



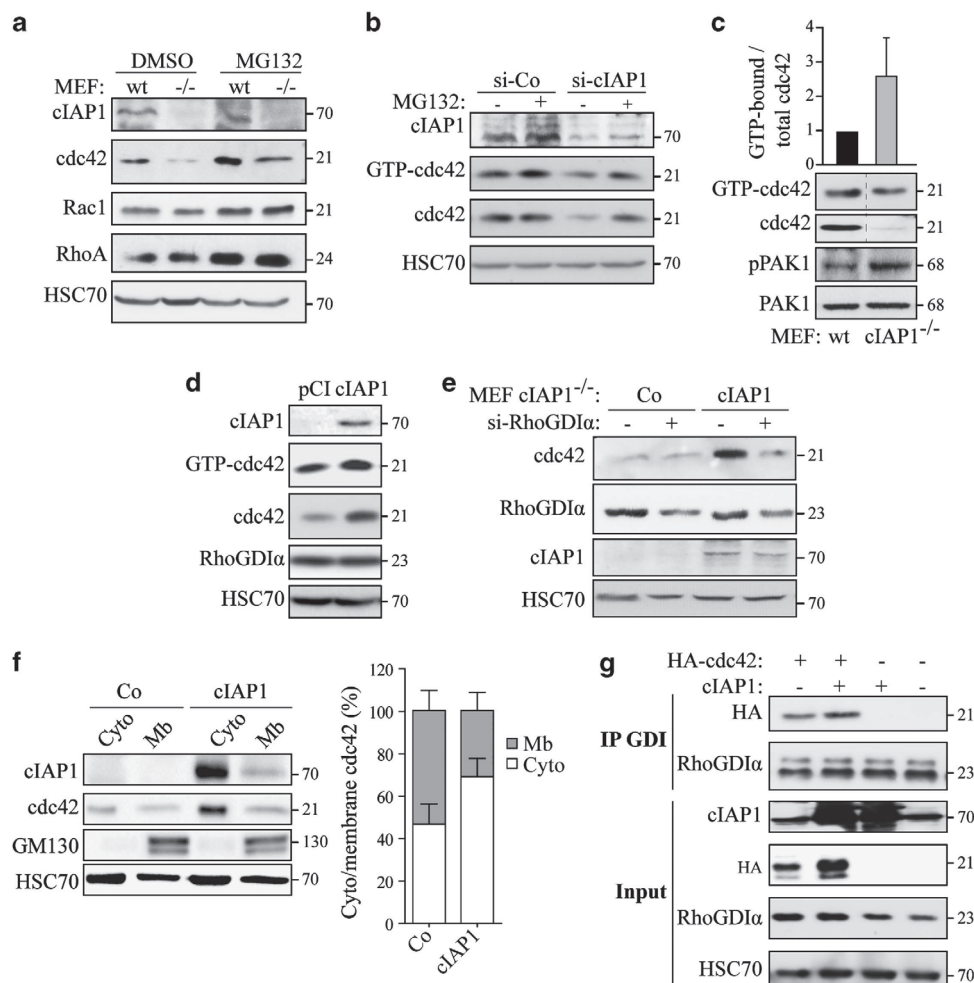
**Figure 1.** The organization of the actin cytoskeleton is altered in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs. **(a)** Microscopic analysis of serum-starved wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs. Left panel: phase contrast images. Right panel: F-actin staining using AlexaFluor488-conjugated Phalloidin. **(b)** Filopodia-like structures were quantified by counting cells showing more than five filopodia-like structures. More than 100 cells were analysed. The mean reflects  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student *t*-test. \*\*\**P* < 0.001; \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05. **(c)** The expression of cIAP1 or cIAP1 mutants, cdc42-N17, I $\kappa$ B-super-repressor (SR), and the efficiency of control (si-Co) or NIK-targeted siRNAs (si-NIK) were checked by western blot analysis. HSC70 was used as the loading control.

exhibited elongated and contracted cell bodies and the presence of subtle fine extended protrusions similar to filopodia (Figure 1a), an effect quantified by counting cells harbouring more than five filopodia-like structures (Figure 1b). Filopodia is specifically controlled by RhoGTPase cdc42.<sup>6</sup> The expression of cIAP1 or a dominant-negative form of cdc42 (cdc42-N17) abolished the filopodia-like structures in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs (Figures 1b and c), demonstrating a cdc42-dependent phenomenon. The adaptor TRAF2 is a well-known partner of cIAP1 that is required for cIAP1 recruitment into the TNFR complex. The expression of the cIAP1<sup>L47A</sup> mutant, which cannot interact with TRAF2<sup>22</sup> (Supplementary Figure 1), or the E3-ubiquitin ligase activity-defective mutant (cIAP1<sup>H588A</sup>), also impeded filopodia-like formation (Figures 1b and c). Depletion of cIAP1 leads to a stabilization of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase NIK and a constitutive activation of NF- $\kappa$ B.<sup>17,26</sup> Neither the silencing of NIK nor the expression of I $\kappa$ B-

super repressor (I $\kappa$ B-SR) abolished spontaneous filopodia in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs significantly (Figures 1b and c). The expression of I $\kappa$ B-super repressor (I $\kappa$ B-SR) did not alter the capacity of cIAP1 to suppress filopodia either (Figures 1b and c), demonstrating that the reorganization of actin cytoskeleton in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs was independent of NF- $\kappa$ B activation.

#### cIAP1 mediates cdc42 stabilization through RhoGDI $\alpha$

A western blot analysis of Rho GTPases demonstrated a reduced expression of cdc42 in cIAP1-depleted cells (Figures 2a and b). However, the GTP-bound/total cdc42 ratio was increased (Figures 2b and c), demonstrating a constitutive activation of cdc42, which was associated with an increase in the phosphorylation of the direct cdc42 effector PAK1 (Figure 2c). Once activated, RhoGTPases can be degraded by the proteasome system. The



**Figure 2.** cIAP1 controls cdc42 stability. **(a)** Immunoblot analysis of cdc42, Rac1 and RhoA in MEFs from wt or cIAP1-deleted mice, treated or not with 40  $\mu$ M MG132 for 4 h. HSC70 was used as the loading control. **(b)** Immunoblot analysis of cdc42 in NIH3T3 cells transfected with cIAP1 targeting siRNA and treated or not with 40  $\mu$ M MG132 for 4 h. Activated GTP-bound cdc42 was pulled down using the GST-PAK1-CRIB domain before immunoblot analysis. HSC70 was used as the loading control. **(c)** Immunoblot analysis of total or GTP-bound cdc42, and total and phosphorylated form of PAK1 in wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs. HSC70 was used as the loading control. Upper panel: The ratio GTP-bound/total cdc42 as quantified by a densitometric analysis of immunoblot. The mean reflects  $\pm$  s.d. of three independent experiments. **(d)** Western blot analysis of total or GTP-bound cdc42 and RhoGDI $\alpha$  in NIH3T3 transfected with cIAP1 encoding vector. HSC70 was used as the loading control. **(e)** Immunoblot analysis of cdc42, RhoGDI $\alpha$  and cIAP1 in MEFs from cIAP1-deleted mice transfected with control or cIAP1 encoding vector plus control or RhoGDI $\alpha$ -targeting siRNA. HSC70 was used as the loading control. **(f)** Immunoblot analysis of cIAP1 and cdc42 in cytosol (Cyto) and membrane (Mb)-enriched fractions from cIAP1-deleted mice transfected with control or cIAP1-encoding vector. GM130 was used as a control for membrane enrichment, and HSC70 was used as the loading control. Right panel: The ratio cytosolic/membrane cdc42 expression as quantified by a densitometric analysis of immunoblots. The mean reflects  $\pm$  s.d. of two independent experiments. **(g)** Overexpression of cIAP1 increases the cdc42-RhoGDI $\alpha$  interaction. HEK293T cells were transfected with HA-cdc42 with or without cIAP1 encoding vectors. RhoGDI $\alpha$  was immunoprecipitated and co-precipitated and revealed by immunoblotting using indicated antibodies.

proteasome inhibitor MG132 prevented the downregulation of cdc42 (Figures 2a and b). Conversely, overexpression of cIAP1 in NIH3T3 or restoration of cIAP1 in cIAP1<sup>-/-</sup> MEF increased the total level of cdc42 (Figures 2d and e, Supplementary Figure 2), mostly in the cytosol-enriched fraction (Figure 2f), and, to a lesser extent, the GTP-bound cdc42 (Figure 2d). On the whole, our data suggest that cIAP1 could stabilize cdc42, mainly in its cytosolic inactive state. RhoGDI $\alpha$  is an important regulator of Rho GTPases that directly binds the proteins and stabilizes the cytosolic inactive forms.<sup>7,27</sup> Silencing of RhoGDI $\alpha$  prevented the cIAP1-mediated upregulation of cdc42 (Figure 2e, Supplementary Figure 2), and overexpression of cIAP1 increased the proportion of RhoGDI $\alpha$  associated with cdc42; that is, co-precipitation experiments showed that an equivalent quantity of RhoGDI $\alpha$  pulled down more cdc42 in cIAP1-overexpressing cells (Figure 2g), demonstrating the importance of RhoGDI $\alpha$  in cIAP1-mediated cdc42 stabilization.

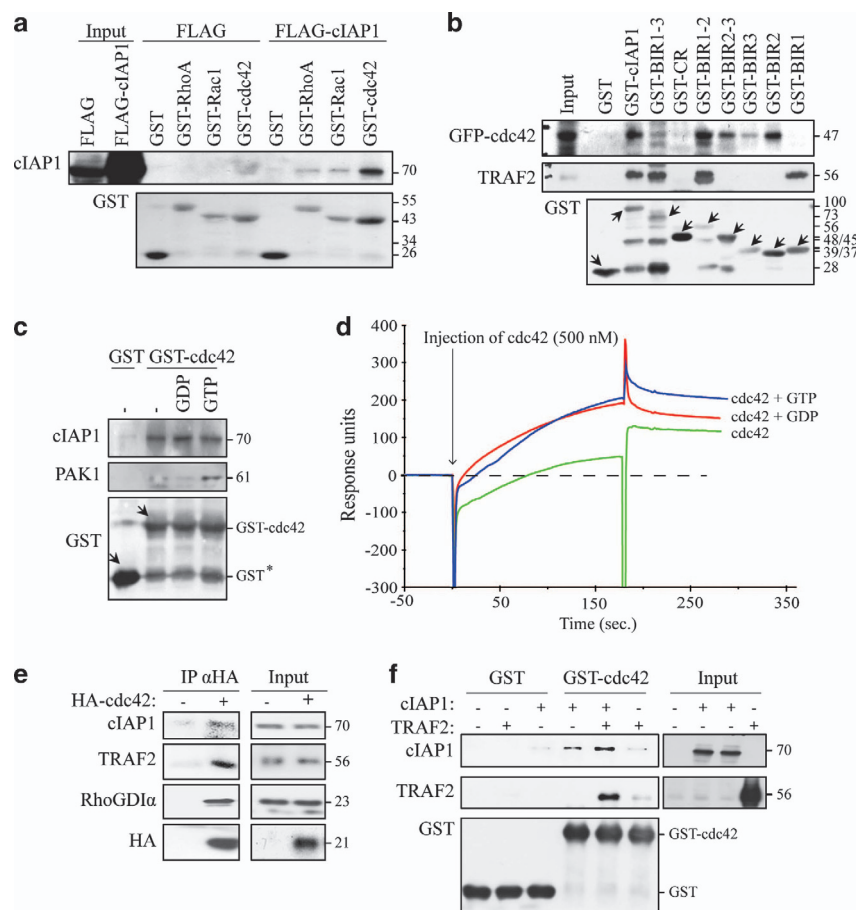
#### cIAP1 interacts with cdc42.

We demonstrated an interaction of cIAP1 with cdc42, RhoA and Rac1 in a glutathione S-transferase (GST) pull-down assay (Figure 3a). Similar results were obtained in a co-immunoprecipitation experiment using Myc-cIAP1 and EGFP-Rho GTPases

(Supplementary Figure 3A). Cdc42 bound to cIAP1 BIR-containing constructs (BIR1–3, BIR 1–2 and BIR 2–3) and to the single BIR2 domain with high affinity, whereas TRAF2 bound to BIR1 (Figure 3b). Both GTP- and GDP-loaded cdc42 bound cIAP1, whereas only the GTP form bound the cdc42 effector PAK1 (Figure 3c, Supplementary Figure 3B). These results were confirmed using the Surface Plasmon Resonance technology (Biacore system) showing that the BIR domains of cIAP1 directly bound GDP- and GTP-loaded recombinant cdc42 with an affinity quite similar (Figure 3d). An interaction of cdc42 with cIAP1, RhoGDI $\alpha$  and TRAF2 was observed *in vivo* in co-immunoprecipitation experiments (Figure 3e). The use of recombinant proteins demonstrated that cIAP1, but not TRAF2, could directly interact with cdc42. However, TRAF2 bound GST-cdc42 in the presence of cIAP1 (Figure 3f).

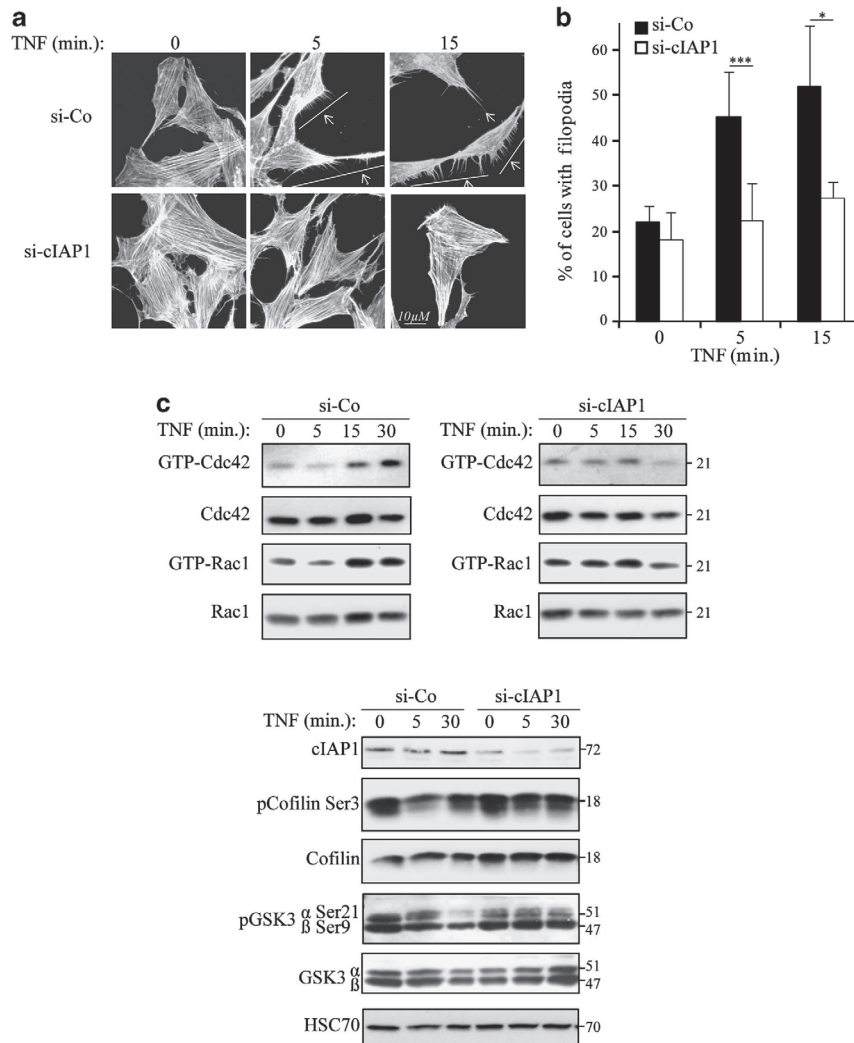
#### cIAP1 is required for TNF-induced filopodia formation and Cdc42 activation

In fibroblasts, TNF induces the activation of cdc42 leading to the formation of filopodia.<sup>4,5,28,29</sup> Accordingly, we observed filopodia in serum-starved NIH3T3 fibroblasts within 15 min of TNF treatment (Figures 4a and b). Simultaneously, TNF activated



**Figure 3.** cIAP1 can interact with cdc42. **(a–c, f)** GST pull-down assay. **(a)** Cell lysates from HEK293T cells transfected with FLAG or FLAG-cIAP1 encoding vector were deposited onto GST-RhoA, -Rac1 or -cdc42 proteins. Interactions were analysed by immunoblotting analysis using anti-cIAP1-specific antibody. **(b)** Lysates from HEK293T cells transfected with GFP-cdc42 encoding vector were incubated with GST-cIAP1 construct fusion proteins as indicated. Interactions were analysed by a western blot using anti-GFP, anti-TRAF2 or anti-GST antibodies. **(c)** GST-cdc42 was immobilized onto glutathione sepharose beads and charged with GDP or GTP before incubating with HEK293T cell lysates. Interactions were revealed by immunoblotting using specific anti-cIAP1 or anti-PAK1 antibodies. **(d)** Surface Plasmon Resonance (Biacore) analysis of the interaction of the BIR domains of cIAP1 with uncharged, GDP- and GTP-charged cdc42 recombinant protein. **(e)** Co-immunoprecipitation analysis of the interaction of HA-cdc42 with cIAP1, TRAF2 and RhoGDI in HEK293T cells transfected with HA-cdc42. Interactions were revealed by immunoblotting using indicated antibodies. **(f)** Recombinant cIAP1 or TRAF2 was incubated with GST-cdc42 immobilized on glutathione sepharose beads. Interactions were evaluated by cIAP1 or TRAF2 immunoblotting.

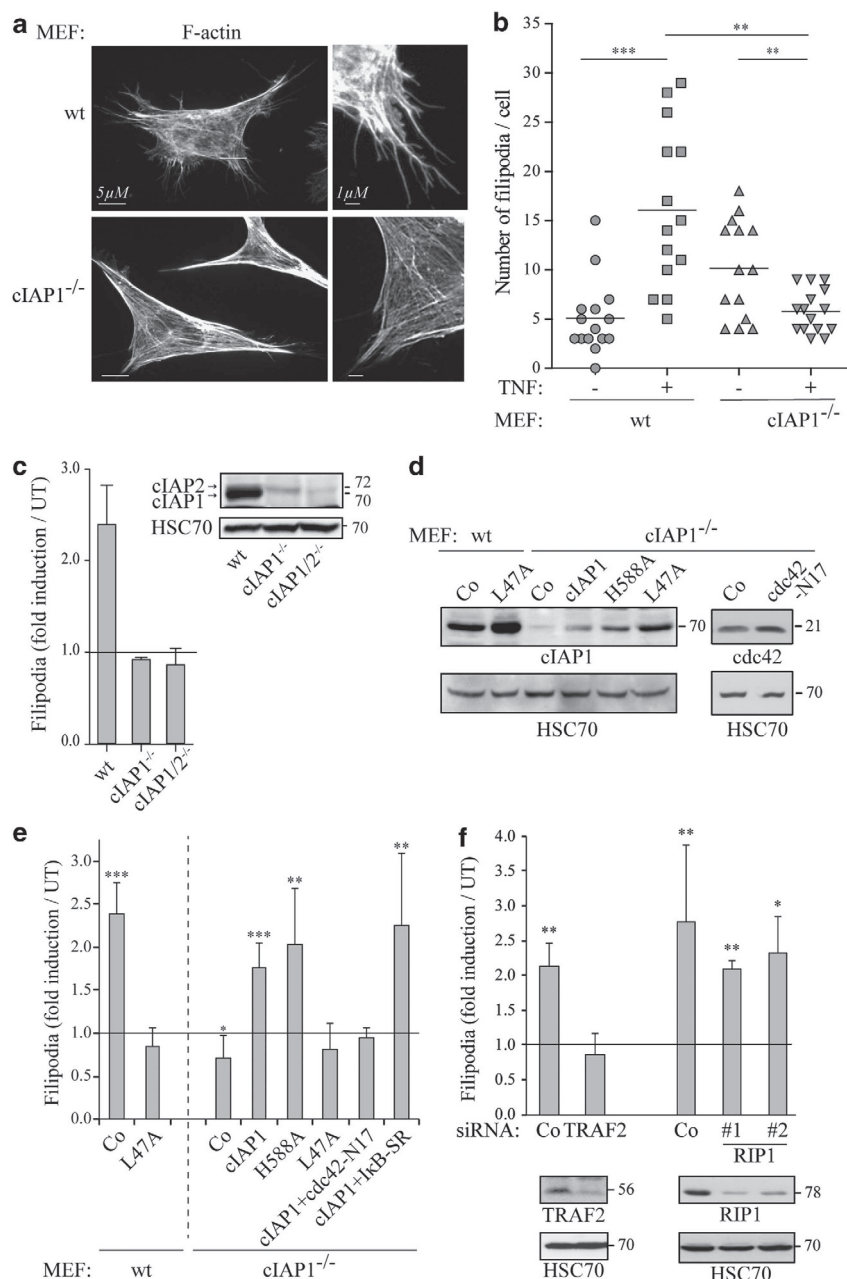




**Figure 4.** Silencing of cIAP1 inhibits TNF-mediated Filopodia formation. NIH3T3 fibroblasts were transfected with control (si-Co) or cIAP1 (si-cIAP1)-targeting siRNAs, serum starved for 16 h and stimulated for an indicated time with 100 ng/ml TNF. **(a, b)** Immunofluorescence analysis of F-actin staining was conducted using AlexaFluor488-conjugated Phalloidin. Filopodia were quantified by counting cells harbouring more than five filopodia **(b)**. More than 100 cells were analysed. The mean reflects  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student *t*-test. \*\*\**P* = 0.004; \**P* = 0.028. **(c)** Western blot analysis of cdc42 and Rac1, total and phosphorylated forms of cofilin and GSK3 $\alpha$  and  $\beta$ . Activated GTP-bound cdc42 and Rac1 were pulled down using the GST-PAK1-CRIB domain before immunoblot analysis. One representative experiment is shown. HSC70 was used as the loading control.

cdc42 and Rac1 Rho GTPases, as indicated by the appearance of GTP-bound Rho GTPases, and induced the dephosphorylation of the downstream effectors GSK3 (serine/threonine protein kinase glycogen synthase kinase-3) and the actin-binding protein cofilin<sup>30</sup> (Figure 4c). siRNA-mediated silencing of cIAP1 prevented the formation of filopodia (Figures 4a and b), the activation of cdc42 and Rac1 and the modifications of Rho GTPase downstream effectors (Figure 4c). cIAP2 siRNA also reduced TNF-induced reorganization of the actin cytoskeleton (Supplementary Figure 4). In MEFs, the TNF-induced filopodia were larger and more abundant compared with the spontaneous filopodia-like structures observed in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs (see Figures 1a and 5a), which was confirmed by counting the number of filopodia per cell (Figure 5b). TNF treatment did not induce the formation of new filopodia, and even significantly decreased spontaneous filopodia structures, in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs (Figures 5a and b), whereas a prolonged exposure induced cell death in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs but not in wt MEFs<sup>17</sup> (Supplementary Figure 5). We did not observe filopodia formation in response to TNF in cIAP1/cIAP2 double

knockout MEFs either (Figure 5c). The ability of cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs to form filopodia in response to TNF was restored by the expression of wild-type cIAP1 as well as the E3-defective mutant cIAP1<sup>H588A</sup> (Figures 5d and e). In contrast, the cIAP1<sup>L47A</sup> mutant did not restore TNF-induced filopodia formation in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs (Figures 5d and e), suggesting a role of TRAF2 in this process. Accordingly, silencing of TRAF2 in wt MEFs inhibited TNF-mediated filopodia formation (Figure 5f), whereas silencing of RIP1, which is the cIAP1-ubiquitin target in the TNF signaling pathway, did not (Figure 5f). The TNF-mediated filopodia formation in cIAP1-reconstituted cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs was totally inhibited by the expression of the dominant-negative form of cdc42 (cdc42-N17), but was not affected by the expression of I $\kappa$ B-SR (Figure 5e). Overall, TNF induced filopodia formation via a cdc42-, cIAP1- and TRAF2-dependent but RIP1- and NF- $\kappa$ B-independent signaling pathway. Moreover, the cIAP1 E3-ubiquitin ligase required for TNF-induced ubiquitination of RIP1 and activation of NF- $\kappa$ B was dispensable. Of note, the expression of the cIAP1<sup>L47A</sup> mutant in wt MEFs inhibited TNF-induced filopodia formation (Figure 5e),



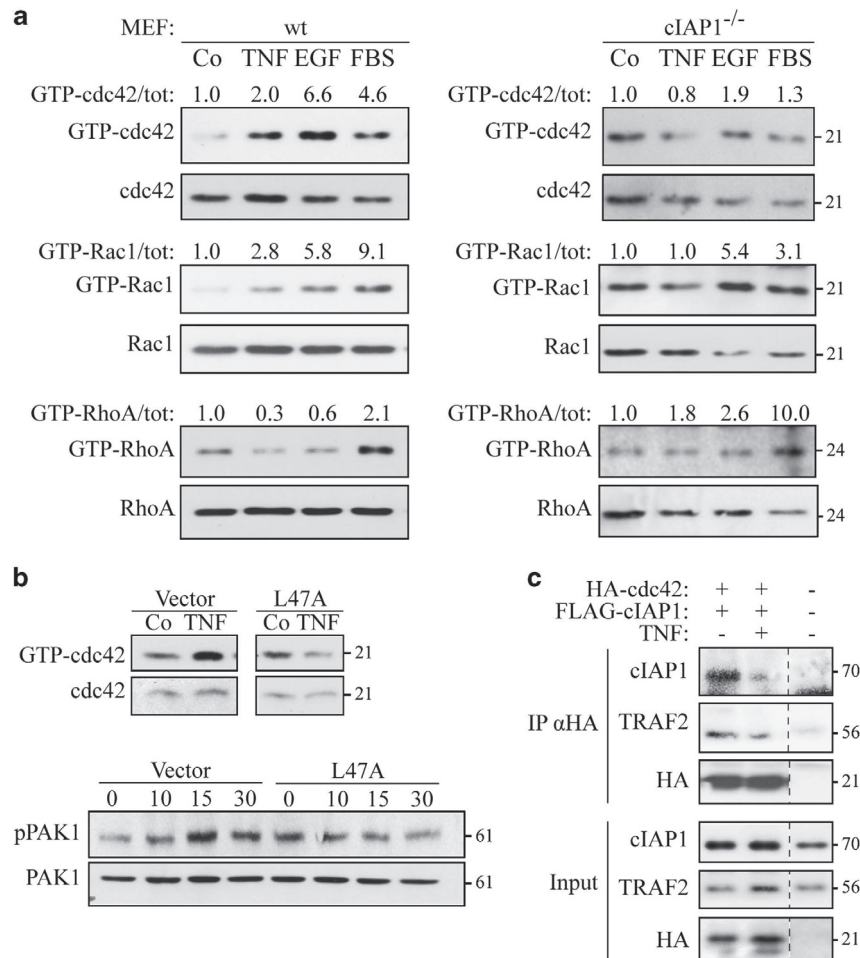
**Figure 5.** TNF-mediated filopodia formation is impaired in MEF cIAP1<sup>-/-</sup>. MEF wt, cIAP1<sup>-/-</sup> (a, b, d-f) or cIAP1<sup>-/-</sup>/cIAP2<sup>-/-</sup> (c) was serum starved for 16 h, and stimulated for 10 min with 100 ng/ml TNF. (a) Microscopic analysis of F-actin stained using AlexaFluor488-conjugated Phalloidin. (b) The number of filopodia per cells was counted. More than 100 cells were analysed. One representative experiment is shown. (c) Filopodia in cIAP1/cIAP2 double knockout MEFs were detected as in A and counted. More than 100 cells were analysed. Results were expressed as fold filopodia induction/untreated cells (UT). The mean  $\pm$  s.d. reflects at least three independent experiments. The expression of cIAP1 and cIAP2 is checked by immunoblotting analysis (right panel). (d-f) Wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs were transfected with encoding plasmid vector (d, e) or si-RNAs (f), serum starved and treated for 10 min with 100 ng/ml TNF. The expression of the constructs and the silencing efficiency were checked by immunoblotting analysis (d, f: lower panel). Filopodia were detected as in A and counted (e, f). More than 100 cells were analysed. Results were expressed as fold filopodia induction/untreated cells (UT). The mean  $\pm$  s.d. reflects at least three independent experiments (d, e). Statistical analysis was performed using the Student t-test. \*\*\* $P$  < 0.001; \*\* $P$  < 0.01; \* $P$  < 0.05.  $N$  > 5 (d) or  $N$  = 3 (e).

suggesting a dominant-negative effect. A co-immunoprecipitation experiment demonstrated that this mutant interacted with endogenous cIAP1 (Supplementary Figure 6).

We then analysed the activation of cdc42, Rac1 and RhoA in response to TNF stimulation in MEFs (Figure 6a). As expected, TNF did not stimulate cdc42 in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs. The activation of Rac1, which occurs downstream of cdc42 in the TNF-signaling pathway,<sup>4</sup> was also abolished. The expression of the cIAP1<sup>L47A</sup>

mutant also decreased TNF-induced cdc42 activation and PAK1 phosphorylation, confirming the dominant-negative effect of this mutant (Figure 6b). Altogether, our results suggest that cIAP1 is required for cdc42 activation in response to TNF. Co-immunoprecipitation experiments showed that TNF exposure decreased the interaction of cIAP1 and TRAF2 with cdc42 (Figure 6c).

Unlike TNF, which induces cdc42-dependent Rac1 activation,<sup>4</sup> EGF activates cdc42 and Rac1 in an independent manner. Deletion



**Figure 6.** Deletion of cIAP1 prevents cdc42 activation. **(a)** Immunoblotting analysis of cdc42, Rac1 and RhoA in MEFs from wt or cIAP1-deleted mice. Cells were serum starved for 16 h, and then stimulated for 10 min with 100 ng/ml TNF or EGF or 10% FBS as indicated. Activated GTP-bound cdc42 and Rac1 were pulled down with the GST-PAK1-CRIB domain and GTP-RhoA with a GST-Rhotekin-Rho binding domain before immunoblot analysis. One representative experiment is shown. The ratio GTP-bound/total GTPases is evaluated by a densitometric analysis of the shown immunoblot. Because of the differential basal level of expression of cdc42 as observed in Figure 3, cell lysates from wt and cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs were deposited onto a separate gel and revealed separately. **(b)** Immunoblotting analysis of cdc42 (GTP-bound and total) and PAK1 (phosphorylated form and total) in NIH3T3 cells transfected with cIAP1<sup>L47A</sup> encoding plasmid vector 24 h before serum starvation. Cells were stimulated for 10 min or for the indicated time with 100 ng/ml TNF. HSC70 was used as a loading control. **(c)** HEK293T cells were transfected with HA-cdc42 and FLAG-cIAP1 and treated or not for 10 min with 100 ng/ml TNF. Immunoprecipitation was performed using an anti-HA antibody and interactions were revealed by immunoblotting using anti-cIAP1, TRAF2 and HA antibodies.

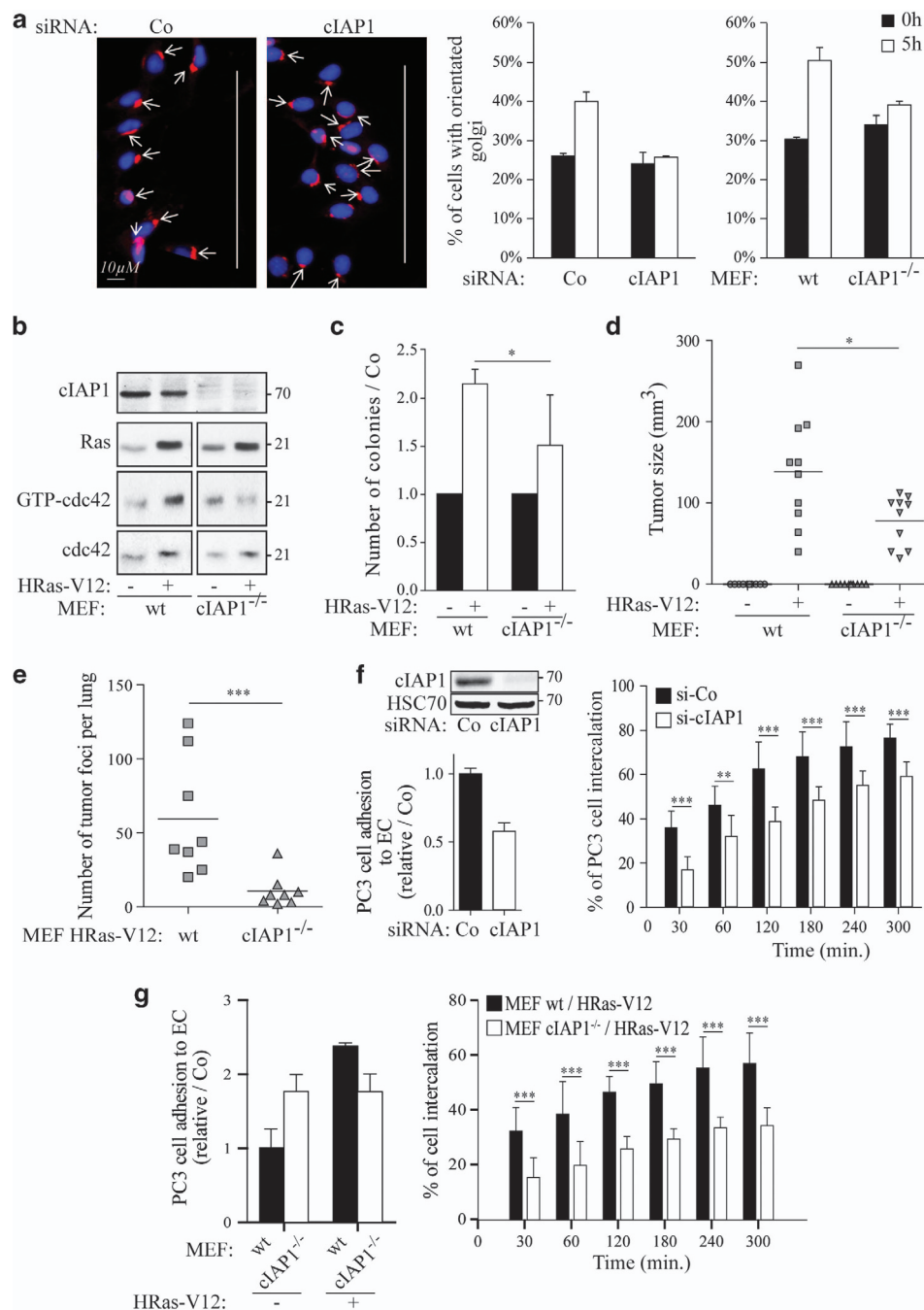
of cIAP1 inhibited EGF-induced cdc42, but not Rac-1 activation (Figure 6a). Moreover, deletion of cIAP1 did not alter serum-induced RhoA activation (Figure 6a), suggesting a specific regulation of cdc42 activation by cIAP1. The EGF-induced filopodia formation was abolished in cIAP1<sup>-/-</sup> MEF and was restored by the expression of cIAP1 (Supplementary Figure 7). Silencing of TRAF2 did not inhibit EGF-induced filopodia formation (Supplementary Figure 7), suggesting a general regulation of cdc42 by cIAP1, whereas TRAF2 specifically regulated the TNF signaling pathway.

#### cIAP1 regulates cdc42 functions

Next, we examined the importance of cIAP1 in the cellular functions of cdc42. cdc42 is a specific regulator of cell polarization.<sup>31,32</sup> A downregulation of cIAP1 significantly affected cell polarization, as evaluated by analysing the Golgi apparatus reorientation to face the leading edge, 5 hours after fibroblast scratching (Figure 7a). cdc42 is also an important intermediate in the Ras-mediated cell anchorage-independent cell growth and

transformation pathways.<sup>33-36</sup> The expression of oncogenic HRas-V12 induced the activation of cdc42, which was completely blocked in cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs (Figure 7b). Deletion of cIAP1 significantly decreased HRas-V12-mediated cell growth in soft agar medium (Figure 7c), inhibited the growth of tumour cells when subcutaneously injected into nude mice (Figure 7d) and delayed the apparition of lung cancer foci after injection of cells into the tail vein (Figure 7e, Supplementary Figure 8).

Several steps of the metastatic process are controlled by RhoGTPases, including the dissemination of tumour cells through the lymph or the blood, their adhesion to vessel endothelium and their subsequent migration through the endothelium to colonize adjacent organs. A recent report from Reymond *et al.* demonstrated that the attachment of cancer cells to the endothelial monolayer and their transendothelial migration is more specifically controlled by cdc42.<sup>37</sup> As demonstrated for cdc42,<sup>37</sup> silencing of cIAP1 significantly reduced the adhesion of PC3 cells to the HUVEC monolayer and their intercalation between endothelial cells (Figure 7f). We then analysed the capacity of MEFs, untransformed or transformed by HRas-V12, to adhere to and



**Figure 7.** cIAP1 regulates cdc42 functions. **(a)** NIH3T3 cells were transfected with control or cIAP1-targeting siRNA. Wound healings were induced by scratching the cell monolayer with a pipette tip. Golgi-apparatus staining (red) was performed in NIH3T3 cells and wt and cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs with an anti-GM130, and nucleus labelling with Hoechst 5h after scratching. Right panel. The percentage of cells with Golgi oriented towards the wound was quantified by counting at least 100 cells (mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments). **(b)** Cdc42 activation in wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs transduced with the HRas-V12 construct. Activated GTP-bound cdc42 was pulled down with the GST-PAK1-CRIB domain before immunoblotting analysis. **(c)** Anchorage-independent growth of HRas-V12-infected wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs. Cells were cultured in soft-agar medium. The number of colonies was evaluated after 10 days of culture. The T-test was used for statistical analysis (\* $P$  < 0.05;  $N$  = 5). **(d)** HRas-V12-infected wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs were injected subcutaneously into nude mice. The tumour was analysed 10 days later (two independent experiments are shown,  $n$  = 5 per group). The Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\* $P$  < 0.05). **(e)** HRas-V12-infected wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs were injected into the tail veins of nude mice. Lung cancer foci were quantified 2 weeks later (two independent experiments are shown,  $n$  = 4 per group). The Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*\* $P$  = 0.0006). **(f)** CSFE-labelled PC3 cells, transfected with control or cIAP1-targeting siRNAs, were added on the HUVEC confluent monolayer. PC3 cell adhesion was quantified by flow cytometry (mean  $\pm$  s.d. of two independent experiments) (left panel). The efficiency of siRNAs was checked by western blot analysis. (Upper panel). PC3 cell intercalation was evaluated by counting cells that display a non-round shape and a low phase-bright by time-lapse microscopy. (> 100 cells were analysed. The mean reflects  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments) (right panel). Statistical analysis was performed using an ANOVA test (\*\*\* $P$  < 0.001; \*\*0.001 <  $P$  < 0.01). **(g)** CSFE-labelled wt or cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs, transduced or not with the HRas-V12 construct, were added on the HUVEC confluent monolayer. MEF adhesion (left panel) and intercalation (right panel) were evaluated as in **(f)** (> 100 cells were analyzed. The mean reflects  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments). Statistical analysis was performed using an ANOVA test (\*\*\* $P$  < 0.001).



intercalate between endothelial cells (supplementary Figure 9). Accordingly, with the presence of filopodia-like structures on the cell surface, the cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs spontaneously adhered to the HUVEC monolayer more strongly compared with the wt counterpart (Figure 7g, left panel). HRas-V12 expression stimulated the attachment of MEFs to the HUVEC monolayer (Figure 7g, left panel). Both the adhesion and the intercalation were decreased in HRas-V12-transformed cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs compared with HRas-V12/wt MEFs (Figure 7g).

## DISCUSSION

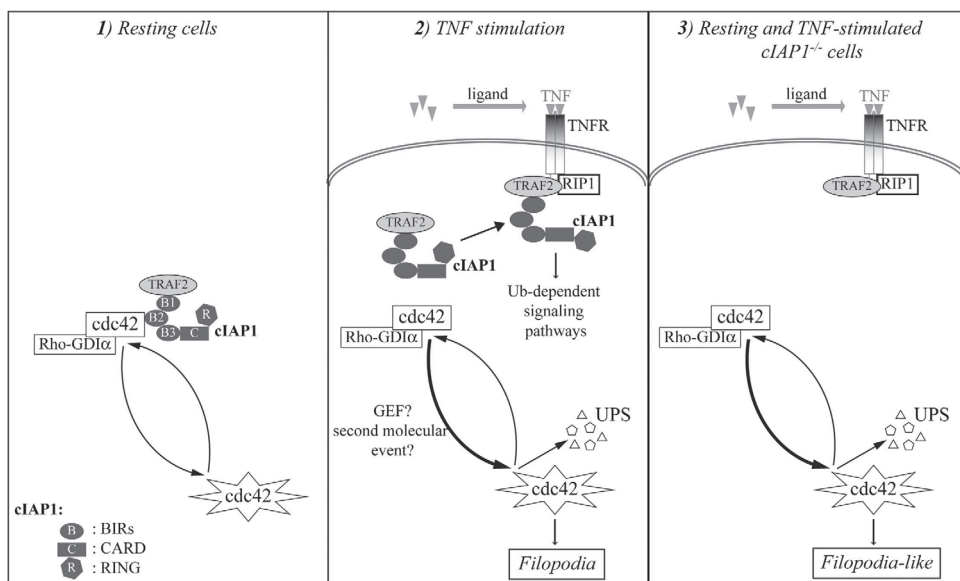
cIAP1 is a key determinant of the cellular response to TNF. The protein is recruited to the TNFR1 through the adaptor TRAF2 and mediates the activation of the canonical NF- $\kappa$ B survival pathway while inhibiting the assembly of the secondary cytoplasmic caspase-activating platform, leading to cell death.<sup>20</sup> We demonstrate here that cIAP1 also regulates actin-cytoskeleton reorganization upon TNF stimulation through a cdc42-dependent, NF- $\kappa$ B-independent pathway. We propose a model (Figure 8) in which cIAP1 could regulate the cycle of cdc42 activation by stabilizing the interaction of cdc42 with its regulator RhoGDI $\alpha$ . The recruitment of TRAF2/cIAP1 to the TNF membrane receptor after TNF stimulation could release cdc42 and allow its activation, leading to the actin cytoskeleton reorganization.

In fibroblasts, TNF induces the rapid and transient formation of filopodia,<sup>38</sup> which requires the Rho GTPase cdc42.<sup>5,39,40</sup> The pathway connecting the TNFR1 to Rho GTPases remains poorly understood but appeared to be independent of NF- $\kappa$ B and MAPK activation.<sup>5,29,38</sup> Accordingly, we observed that TNF induced filopodia formation in the presence of an I $\kappa$ B super-repressor. TNFR engagement triggers the TRAF2-dependent recruitment of cIAP1, which induces an autoubiquitination and the ubiquitination of RIP1 necessary for NF- $\kappa$ B activation.<sup>20</sup> We demonstrate that TNF-induced filopodia formation requires cIAP1 and TRAF2, whereas RIP1 and the E3-ubiquitin ligase of cIAP1 are dispensable, suggesting that the TNFR-associated complex can generate independent signaling pathways leading to NF- $\kappa$ B activation or filopodia formation. cIAP1 can directly bind to

cdc42, whereas TRAF2 can bind to cdc42 only in the presence of cIAP1. Both cIAP1 and TRAF2 co-precipitate with cdc42 in resting cells, and TNF treatment decreased this interaction. Our hypothesis is that the recruitment of cIAP1/TRAF2 to TNFR makes cdc42 activation easier, leading to actin cytoskeleton reorganization (Figure 8). Secondary molecular events are likely required for the full activation of cdc42, as the activation of Rho GTPases requires a GEF. Vav is a Rac1-GEF in TNF $\alpha$  signaling in fibroblasts,<sup>29</sup> and the GEF Ect2 has been involved in the TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-induced cdc42 activation in glioblastoma;<sup>41</sup> however, their role in cdc42 activation has to be explored in this cell context.

cIAP1 appears to fine-tune cdc42 activation. On one hand, cIAP1 deletion inhibits cdc42 activation in response to TNF and EGF stimulation and HRas-V12 expression; on the other hand, downregulation of cIAP1 decreases the expression of the whole cdc42 in a proteasome-dependent manner but increases the expression of the activated fraction of cdc42. The downregulation of cIAP1 also promotes the phosphorylation of PAK1, a cdc42 effector, and cIAP1<sup>-/-</sup> MEFs spontaneously form filopodia-like structures. Interestingly, RhoGDI $\alpha$  depletion infers similar modifications, including a decreased cdc42 protein level that can be prevented by inhibiting the proteasome, and an increased ratio of active to total cdc42.<sup>27</sup> RhoGDI $\alpha$  is a Rho chaperone; that is, it maintains a pool of cytoplasmic GTPases in a GDP-bound inactive state and protects them from proteasomal degradation.<sup>27,42</sup> The expression of cIAP1 increases the cytosolic cdc42 expression in a RhoGDI $\alpha$ -dependent manner and enhances the fraction of the cdc42 bound to RhoGDI $\alpha$ . Overall, these data argue for a RhoGDI $\alpha$ -mediated regulation of cdc42 by cIAP1.

The regulation of RhoGTPases by IAPs is evolutionarily conserved; that is, it has been observed in *Drosophila*<sup>43</sup> and *Zebrafish*.<sup>25</sup> Identical to RhoGDI $\alpha$ ,<sup>42</sup> cIAP1 (present work), XIAP<sup>25</sup> and DIAP1<sup>43</sup> can bind to both GDP- and GTP-bound GTPases. DIAP1 controls Rac activity independently of its E3-ubiquitin ligase domain,<sup>43</sup> whereas XIAP promotes the ubiquitination and degradation of the active GTP-bound form of Rac1.<sup>25</sup> We observed an interaction of cIAP1 with Rac1, RhoA and cdc42. In our study, cIAP1 failed to ubiquitinate cdc42 (Supplementary Figure 10),



**Figure 8.** Model for the regulation of cdc42 by cIAP1/TRAF2. cIAP1 interacts with TRAF2 via the BIR1 (B1) domain and with cdc42 via the BIR2 (B2) domain. (1) In resting cells, cIAP1 binds cdc42. It stabilizes its interaction with its regulator RhoGDI $\alpha$  and then regulates cdc42 activation. (2) The recruitment of TRAF2/cIAP1 to the receptor after TNF stimulation releases cdc42 and makes its activation easier, leading to cytoskeleton reorganization and filopodia formation. (3) Depletion of cIAP1 induces a loss of control of cdc42 and increases the activation/degradation cycle, leading to cytoskeleton modifications and a filopodia-like structure.

suggesting that IAPs could differentially modulate various Rho GTPases. RhoA, Rac1 and cdc42 compete for the binding to and chaperoning by RhoGDI $\alpha$ , and the stabilization of the interaction of one Rho GTPase with RhoGDI $\alpha$  favours the degradation of the others.<sup>27</sup> cIAP1 becomes a part of this crosstalk regulatory mechanism by stabilizing cdc42–RhoGDI $\alpha$  interaction (present work) and catalysing the proteasomal degradation of Rac1.<sup>25</sup> Moreover, an inhibition of the SUMOylation of RhoGDI $\alpha$  by XIAP has been described<sup>44</sup> and a recent study identified RhoGDI2 as a potential IAP neddylation substrate.<sup>45</sup> As central regulators of Rho GTPase homeostasis, IAPs could regulate their sequential activation in many biological processes such as intracellular vesicular traffic, morphogenesis, tissue repair, cell shape, plasticity, polarization, adhesion and motility.<sup>42</sup> In *Drosophila*, overexpression of DIAP1 compensates the invalidation of rac in the control of border cell migration during oogenesis.<sup>43</sup> In mammals, the depletion of cIAPs or XIAP alters the invasive properties of cancer cells, including their migration,<sup>19,25,44,46</sup> their adhesion to the endothelium and their intercalation between endothelial cells, which can be related to the deregulation of Rho GTPase homeostasis.<sup>25,43,44</sup>

Our results indicate a regulatory function for cIAP1 in cdc42-controlled filopodia formation, cell polarization and adhesion.<sup>39,47</sup> The contribution of cdc42 to some oncogenic processes,<sup>6</sup> for example, HRas-V12-driven cell transformation<sup>33,35,36</sup> and metastatic invasion,<sup>37</sup> may account for the anti-tumour activity of small molecule inhibitors of IAPs, such as Smac mimetics.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and treatments

Mouse embryonic immortalized (SV40) fibroblasts (MEF) wt and cIAP1<sup>−/−</sup> and cIAP1<sup>−/−</sup>/cIAP2<sup>−/−</sup> (J. Silke, Melbourne, Australia), mouse NIH3T3 fibroblasts and HEK293T cells were cultured in DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza). Cells were serum starved for 16 h before stimulation with 100 ng/ml TNF or EGF (Shenandoah Biotechnology Inc, Warwick, PA, USA). MG132 (Millipore, Calbiochem, Billerica, MA, USA) was used at 40  $\mu$ M for 4 hours. PC3 cells were cultivated in RPMI-1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza). Primary HUVECs (Lonza) were maintained in EBM2 medium (Lonza).

Plasmid constructs, siRNAs, cell transfection and viral transduction NIH3T3 fibroblasts were transfected using Lipofectamine 2000 (Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and MEFs and HEK293T were transfected using JET PEI (Polyplus transfection, Illkirch, France). Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used for the transfection of siRNA targeting mouse NIK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), cIAP1, TRAF2, RIP1 or RhoGDI $\alpha$  (designed and provided by Qiagen, Venlo, The Netherlands). The DNA constructs used were pCR3-Flag-cIAP1, pCR3-flag-cIAP1<sup>L47A</sup>, pCI-cIAP1, pCI-cIAP1<sup>H588A</sup>, pCI-cIAP1<sup>L47A 22</sup>, pGEX-cIAP1<sup>WT</sup>, pGEX-cIAP1<sup>BIR1-3</sup> (amino-acid 1–483), pGEX-cIAP1<sup>CARD-RING</sup> (amino-acid 452–618), pGEX-cIAP1<sup>BIR1-2</sup> (amino-acid 1–258), pGEX-cIAP1<sup>BIR2-3</sup> (amino-acid 181–363), pGEX-cIAP1<sup>BIR1</sup> (amino-acid 34–129), pGEX-cIAP1<sup>BIR2</sup> (amino-acid 170–260), pGEX-cIAP1<sup>BIR3</sup> (amino-acid 256–358),<sup>48</sup> pMT90-Myc-cdc42<sup>N17</sup>, pCDNA-HA-cdc42<sup>WT</sup>, pEGFP-cdc42, pEGFP-RhoA, pEGFP-Rac1, pGEX-RhoA, pGEX-Rac1, pGEX-cdc42, pRcCMV-IkB-SR and pBABE-HRas<sup>V12</sup>. HRas-V12 expressing MEFs were generated by retroviral transduction. Phoenix-Eco cells (Invitrogen), which constitutively produced gag-pol and ecotropic envelope proteins, were transfected using Jet PEI (Polyplus transfection) with pMSCV-HRas-V12. MEFs were transduced overnight with the retroviral-containing supernatant supplemented with 1  $\mu$ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Populations of transduced cells were selected by puromycin exposure. The efficiency of infection was checked by western blot analysis.

### Immunofluorescence analysis of filopodia and cell polarity

Cells were grown and transfected on a chamber slide (Labtek, Thermo Fisher Scientific, Nunc), serum starved for 16 h and stimulated with TNF or EGF. Cells were then washed twice with pre-warmed PBS, fixed for 10 min

in 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized using 0.1% triton X-100 (10 min) and saturated for 20 min in 2% bovine serum albumin. Actin cytoskeleton was labelled with AlexaFluor488-Phalloidin (Invitrogen) in PBS/BSA 0.5% for 30 min. Cells were mounted on glass slides using FluorSave (Millipore, Billerica, MA, USA) and examined using a fluorescence (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Champigny, France) or a confocal (Leica TCS SP2; Leica, Bron, France) microscope. Filopodia were quantified by counting cells displaying more than five filopodia or by counting the number of filopodia/cell. More than 100 cells were analysed.

Cell polarity was assessed by an analysis of the Golgi apparatus orientation in a wound-scratch test. Briefly, after wounding, cell monolayers were fixed and subjected to nucleus and Golgi staining using Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) and AlexaFluor568-conjugated anti-GM130 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), respectively. The percentage of cells (>150) with their Golgi orientated towards the wound was evaluated.

### Cellular extracts, cell fractionation, immunoprecipitation and western blot analysis

Cells were lysed in RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, NP-40 1%, DOC 0.5%, SDS 0.1%) or Phospho (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, NP-40 2%, Glycerol 10%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaF 10 mM, Sodium orthovanadate 1 mM, phosphatase inhibitor phosphatase 2 and 3) buffers complemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). Primary antibodies used for western blotting were goat anti-cIAP1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and GST (Rockland Immunochemicals, Philadelphia, Pennsylvania, USA), rabbit anti-GFP (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), RhoGDI $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), PAK1, p-PAK1, Cofilin, p-Cofilin, GSK3 $\alpha/\beta$ , p-GSK3 $\alpha/\beta$  (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA) and TRAF2 (Millipore Corporation, Upstate, Billerica, Massachusetts, USA), and mouse anti-HA (Covance), Rac1 (Upstate), cdc42 (Becton, Dickinson and Company), RhoA (Cytoskeleton Inc, Denver, CO, USA), cIAP2, pan-cIAPs (R&D Systems, Cyclex), GM130 (Becton, Dickinson and Company) and HSC70 (Santa Cruz Biotechnology Inc). The western blot analysis was performed as previously described.<sup>22</sup> Cell fractionation experiments were performed using the Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

For immunoprecipitations, cells were lysed in IP buffer (50 mM TrisHCl pH7.5, NaCl 100 mM, NP-40 2%, Glycerol 10%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaF 10 mM, Sodium orthovanadate 1 mM protease inhibitor cocktail) and incubated for 4 h at 4°C in the presence of rabbit polyclonal anti-RhoGDI $\alpha$  or mouse anti-HA and then for 1 h in the presence of mixed A+G agarose beads (Millipore). Beads were washed in IP buffer and denatured in Laemmli buffer 2X before immunoblot analysis.

### Rho GTPase activation assays

Cells were lysed in GTPase buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, NP-40 2%, Glycerol 10%, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, protease inhibitor cocktail). The active forms of RhoA, rac1 or cdc42 were selectively pulled down by the GST-Rhotekin-Rho binding domain or GST-PAK1-CRIB domain fused to glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA). Beads were washed three times and eluted in Laemmli 2X, and precipitated GTP-RhoA or Rac or Cdc42 was detected by western blot analysis using an anti-RhoA or Rac1 or Cdc42 antibody.

### GST pull-down assay

GST fusion proteins were produced in *Escherichia coli*, immobilized on glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA) and incubated with either tagged protein-expressing HEK293T cell lysates or recombinant cIAP1 or TRAF2 (SignalChem, Richmond, Canada). The pull-down proteins were revealed by western blot analysis. Recombinant cIAP1 protein was produced using a TNT-quick coupled transcription/translation system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. For the analysis of the interaction with the GDP- or GTP-bound form of cdc42, GST-cdc42 or cdc42 from cell lysates was charged with GDP (1 mM) or GTP $\gamma$ S (0.1 mM) (Millipore) in 0.5 M EDTA for 15 min at 30°C under agitation before the pull-down assay. The reaction was stopped by adding 60 mM MgCl<sub>2</sub>.

## Surface Plasmon Resonance (Biacore) analysis

Design and fabrication of homemade chips compatible with Surface Plasmon Resonance was routinely performed with the help of the MIMENTO technological platform, Besançon, France. The cIAP1-BIRs chips fabricated in this study consisted in the covalent grafting of cIAP1 entities on a chemically activated self-assembled monolayer following the procedure of protein chip building recently published.<sup>49</sup> This procedure was performed in a 10 mM acetate buffer (pH4.5) and led to a surface coverage of approximately 8 fmol/mm<sup>2</sup> of cIAP1-BIRs per spot. Biacore experiments were performed with the Biacore 2000 apparatus at 25 °C with a flow rate between 2 and 30 µl/min. Purified cdc42 was charged with GDP (1 mM) or GTPγS (0.1 mM) (Millipore) in 0.5 M EDTA for 15 min at 30 °C under agitation and injected into the Biacore. Protein–protein interaction was monitored using Biacore 200 control software (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK) and analysed using Bievaluation 3.2 RCI software (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK).

## Soft agar colony formation

Cells (50 000 cells/well) were cultured in 0.45% agarose in growth media and layered on top of 0.75% agarose growth media in a six-well dish. Colonies were counted under a light microscope 2–3 weeks post plating. For each experiment, cells were seeded in triplicate and three fields per well were quantified.

## Mouse tumoural models

Exponentially growing HRas-V12 and control-transduced MEF cells (1 × 10<sup>6</sup> /100 µl PBS) were s.c. injected into the flank of nude mice. Tumour growth was monitored by measuring with calipers in two perpendicular diameters, and tumour volumes were calculated using the formula  $v = a^2b/2$  ( $a < b$ ). For the analysis of lung colonization, HRas-V12-transduced MEFs (1 × 10<sup>6</sup> /100 µl PBS) were injected into the tail veins of nude mice. The mice were killed 2 weeks later, and the number of tumour foci at the lung surface was counted. Lungs were fixed and sections were stained with haematoxylin and eosin and observed using AxioZOOM V16 (Carl Zeiss, Oberkoren, Germany). The experiments were performed twice  $n = 4–5$  per group.

## Cell adhesion and intercalation

Cell adhesion and intercalation assay was performed as previously described.<sup>37</sup> Briefly, 130 000 CFSE-labelled PC3 cells or MEFs were added onto confluent HUVECs in 24-well plates and washed twice with PBS. Cells were trypsinized and adherent cells were quantified using a LSRII flow cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). For the analysis of intercalation, 150 000 PC3 cells or MEFs were added onto confluent HUVECs in 6-well plates. Cells were monitored by time-lap microscopy in a humidified chamber at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> with an inverted microscope AxioVert 200 M (Carl Zeiss) equipped with a motorized stage with a 10x objective lens and using AxioVision software (Carl Zeiss). Cells were tracked manually using AxioVision software and cells were considered as intercalated when they were no more round, when they were no longer phase-bright and were clearly part of the HUVEC monolayer, as shown in Supplementary Figure 9.

## Statistical analysis

Student's *t* test, ANOVA or the Mann–Whitney test was used for statistical analysis

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr J Silke, Dr E Lemichez, Dr S Gasman, Dr CL Day, Dr S Ansieau, Dr R Weil and S Monier for kindly providing plasmids and cell lines. We are grateful to Lydie Desoche, Aziza Aznague, Cedric Seigneux and Benoit Simon (FEMTO-ST, CLIPP platform) for their technical assistance. We thank A Bouchot and B Gasquet (Cellmap Imagery Facility), A Hammann (Cytometry platform), V Saint-Giorgio (Animal Facility), A Oudot and B Collin (Precilinal imagery platform, Georges-François Leclerc Center) for the use of the imagery, cytometry and animal facilities. We thank P Meier, K Rajalingam, J Bréard, M David and S Ansieau for helpful discussions. This work was supported by grants from the 'Comité de Côte d'Or of the Ligue Contre

le Cancer' (LD), the 'Association pour la Recherche sur le Cancer' (ARC to LD), the Association 'Cent pour sang la Vie' (LD), the European Union and the 'Conseil Régional de Bourgogne', a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program 'Investissements d'Avenir' with reference ANR-11-LABX-0021', and fellowships from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' of France (to AM, JB, JC), ARC (JC) and the 'Société Française d'Hématologie' (AM).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM and JB performed most of the experiments and analysed the data. JB performed the *in vivo* experiment and analysis. JC performed additional experiments and data analysis. CP and AM contributed to the *in vivo* analysis. SG and WB performed the biacore experiments and analysis. MS and JB provided valuable materials and expert evaluation. ES provided expert evaluation and corrected the paper and LD conceived and supervised the project, analysed the data and wrote the paper with input from all authors.

## REFERENCES

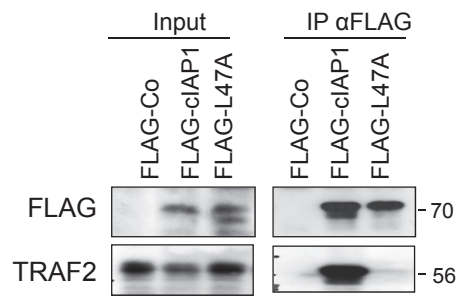
- Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; **20**: 87–103.
- Mathew SJ, Haubert D, Kronke M, Leptin M. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci* 2009; **122**: 1939–1946.
- McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- $\alpha$ -induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol* 2007; **213**: 221–228.
- Peppelenbosch M, Boone E, GE Jones, van Deventer SJ, Haegeman G, Fiers W et al. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J Immunol* 1999; **162**: 837–845.
- Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, Hall A. Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF( $\alpha$ ) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* 1999; **112**: 2983–2992.
- Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* 2011; **23**: 1415–1423.
- Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**: 493–504.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; **114**: 181–190.
- Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreau A, Durkin J et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 2008; **30**: 689–700.
- Dynek JN, Goncharov T, Dueber EC, Fedorova AV, Izrael-Tomasevic A, Phu L et al. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *Embo J* 2010; **29**: 4198–4209.
- Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, Rieser E et al. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 2009; **36**: 831–844.
- Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 24295–24299.
- Silke J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave. *Curr Opin Immunol* 2011; **23**: 620–626.
- Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M et al. cIAPs block ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* 2011; **43**: 449–463.
- Wang L, Du F, Wang X. TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; **133**: 693–703.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, Laukens B, Zobel K, Deshayes K et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 656–665.
- Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell* 2007; **131**: 682–693.
- Gyrd-Hansen M, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, Xue W et al. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 1309–1317.
- Lopez J, John SW, Tenen T, Rautureau GJ, Hinds MG, Francalanci F et al. CARD-Mediated Autoinhibition of cIAP1's E3 Ligase Activity Suppresses Cell Proliferation and Migration. *Mol Cell* 2011; **42**: 569–583.
- Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 561–574.

- 21 Xu L, Zhu J, Hu X, Zhu H, Kim HT, LaBaer J *et al.* c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol Cell* 2007; **28**: 914–922.
- 22 Cartier J, Berthelet J, Marivin A, Gemble S, Edmond V, Plenchette S *et al.* Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription. *J Biol Chem* 2011; **286**: 26406–26417.
- 23 Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J *et al.* Non-canonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1371–1378.
- 24 Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H *et al.* Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1364–1370.
- 25 Oberoi TK, Dogan T, Hocking JC, Scholz RP, Mooz J, Anderson CL *et al.* IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *Embo J* 2011; **31**: 14–28.
- 26 Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 2007; **131**: 669–681.
- 27 Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ *et al.* Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 477–483.
- 28 Haubert D, Gharib N, Rivero F, Wiegmann K, Hosel M, Kronke M *et al.* PtdIns(4,5)P-restricted plasma membrane localization of FAN is involved in TNF-induced actin reorganization. *Embo J* 2007; **26**: 3308–3321.
- 29 Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang ZY, Neel BG, Flavell RA *et al.* TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev* 2011; **25**: 2069–2078.
- 30 Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* 2008; **87**: 649–667.
- 31 Iden S, Collard JG. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 846–859.
- 32 Etienne-Manneville S. Cdc42—the centre of polarity. *J Cell Sci* 2004; **117**: 1291–1300.
- 33 Stengel KR, Zheng Y. Essential role of cdc42 in ras-induced transformation revealed by gene targeting. *PLoS One* 2012; **7**: e37317.
- 34 Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, Shirasawa S *et al.* BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer* 2011; **10**: 118–138.
- 35 Cheng CM, Li H, Gasman S, Huang J, Schiff R, Chang EC. Compartmentalized Ras proteins transform NIH 3T3 cells with different efficiencies. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 983–997.
- 36 Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 3449–3458.
- 37 Reymond N, Im JH, Garg R, Vega FM, Borda d'Agua B, Riou P *et al.* Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through beta1 integrin. *The Journal of cell biology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]* 2012; **199**: 653–668.
- 38 Gadea G, Roger L, Anguille C, de Toledo M, Gire V, Roux P. TNFalpha induces sequential activation of Cdc42- and p38/p53-dependent pathways that antagonistically regulate filopodia formation. *J Cell Sci* 2004; **117**: 6355–6364.
- 39 Yang L, Wang L, Zheng Y. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 4675–4685.
- 40 Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* 1997; **110**: 707–720.
- 41 Fortin SP, Ennis MJ, Schumacher CA, Zylstra-Diegel CR, Williams BO, Ross JT *et al.* Cdc42 and the guanine nucleotide exchange factors Ect2 and trio mediate Fn14-induced migration and invasion of glioblastoma cells. *Mol Cancer Res* 2012; **10**: 958–968.
- 42 Boulter E, Estrach S, Garcia-Mata R, Feral CC. Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. *FASEB J* 2012; **26**: 469–479.
- 43 Geisbrecht ER, Montell DJ. A role for drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* 2004; **118**: 111–125.
- 44 Liu J, Zhang D, Luo W, Yu Y, Yu J, Li J *et al.* X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) mediates cancer cell motility via Rho GDP dissociation inhibitor (RhoGDI)-dependent regulation of the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2011; **286**: 15630–15640.
- 45 Zhuang M, Guan S, Wang H, Burlingame AL, Wells JA. Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the neddyator. *Mol Cell* 2013; **49**: 273–282.
- 46 Dogan T, Harms GS, Hekman M, Karreman C, Oberoi TK, Alnemri ES *et al.* X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 1447–1455.
- 47 Hehnly H, Xu W, Chen JL, Stamnes M. Cdc42 regulates microtubule-dependent golgi positioning. *Traffic* 2010; **11**: 1067–1078.
- 48 Mace PD, Smits C, Vaux DL, Silke J, Day CL. Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J Mol Biol* 2010; **400**: 8–15.
- 49 Grandclement C, Pallandre JR, Valmary Degano S, Viel E, Bouard A, Bolland J *et al.* Neuropilin-2 expression promotes TGF-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *PLoS One* 2011; **6**: e20444.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

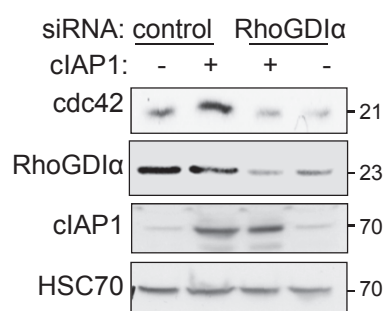


## **Supplementary Figure 1**



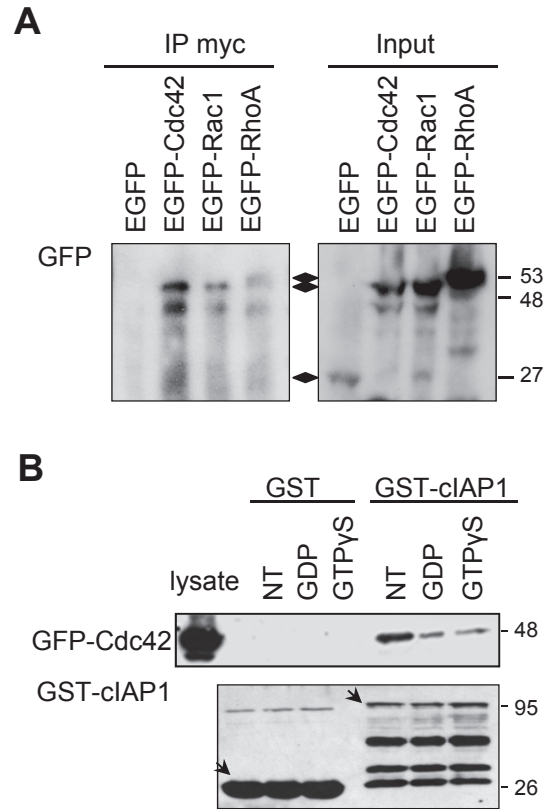
**Figure S1.** Immunoprecipitation analysis of the interaction of cIAP1 and the mutant L47A with TRAF2. 293T cells were transfected with indicated FLAG-constructs. FLAG was immunoprecipitated with specific antibody and the interaction was revealed using an anti-FLAG or an anti-TRAF antibody.

## **Supplementary Figure 2**



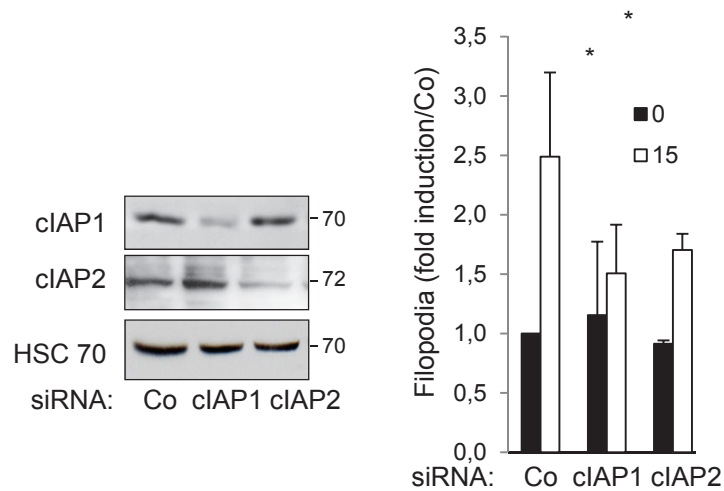
**Figure S2.** Immunoblot analysis of cdc42, RhoGDI $\alpha$  and clAP1 in NIH3T3 transfected with clAP1 encoding vector plus Control or RhoGDI $\alpha$ -targeting siRNA. HSC70 is used as loading control.

### Supplementary Figure 3



**Figure S3. cIAP1 can interact with cdc42.** (A) Co-immunoprecipitation analysis of the interaction of cIAP1 with RhoA, Rac1 and cdc42. HEK293T cells were transfected with myc-clAP1 and EGFP, EGFP-RhoA, EGFP-Rac1 or EGFP-cdc42 encoding vector. Immunoprecipitation was performed using anti-myc antibody and interactions were revealed by immunoblotting using anti-GFP antibody. (B) GFP-cdc42 from transfected HEK293T cell lysates was charged with GDP or GTP, and incubated with GST or GST-clAP1 immobilized onto glutathione sepharose beads. Interactions were revealed by immunoblotting using specific GFP antibody.

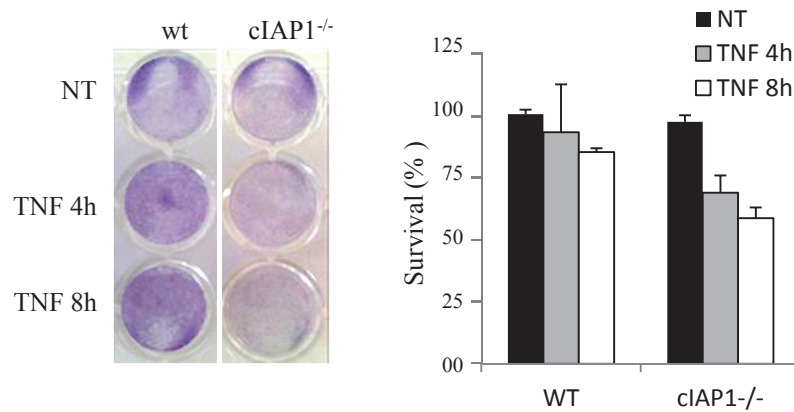
### Supplementary Figure 4



**Figure S4. Silencing of cIAPs inhibits TNF $\alpha$ -mediated Filopodia formation.** NIH3T3 fibroblasts were transfected with control (Co), cIAP1 or cIAP2 targeting siRNA, serum starved for 16 hours and stimulated for 15 min. with 100ng/mL TNF $\alpha$ . **Left panel:** The efficiency of siRNA was checked by immunoblot analysis. HSC70 is used as loading control. **Right panel:** Filopodia were quantified by counting cells exposing more than 5 filopodia. > 100 cells were analyzed. Results were expressed as fold filopodia induction/untreated cells transfected with control siRNA. Mean  $\pm$  sd of three independent experiments. Statistical analysis performed using the Student's *t*-test. \*:  $p < 0,05$ .

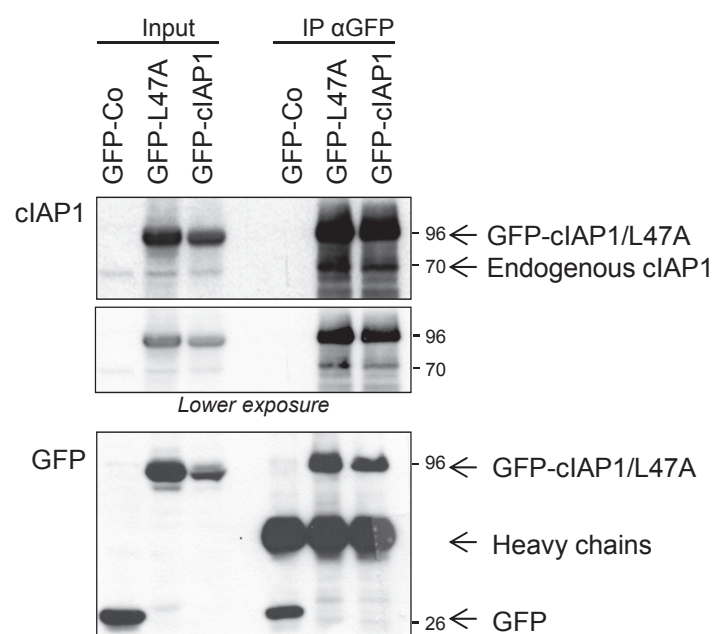


### Supplementary Figure 5



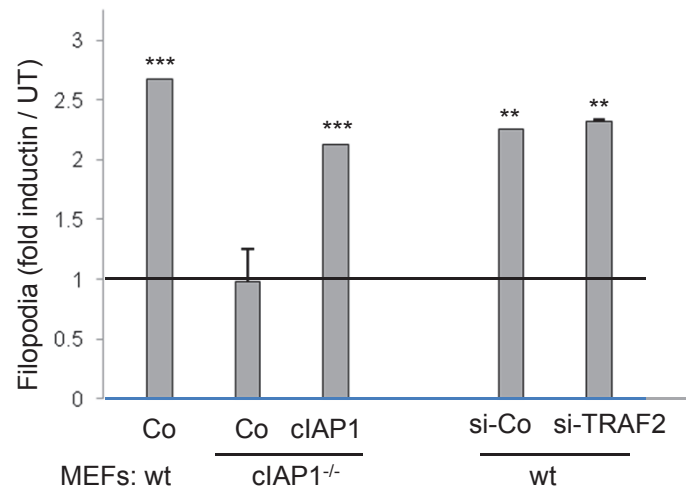
**Figure S5.** MEF cIAP1<sup>-/-</sup> are sensitive to TNF-induced cell death. MEF wt or cIAP1<sup>-/-</sup> were serum starved for 16 hours, then stimulated for 4 or 8 hrs with 100ng/mL TNF. Cell viability was evaluated by a crystal violet staining (**Left panel**: One representative experiment is shown) and quantified after elution by a colorimetric analysis (**Right panel**: Mean  $\pm$  sd of three independent experiments).

## Supplementary Figure 6



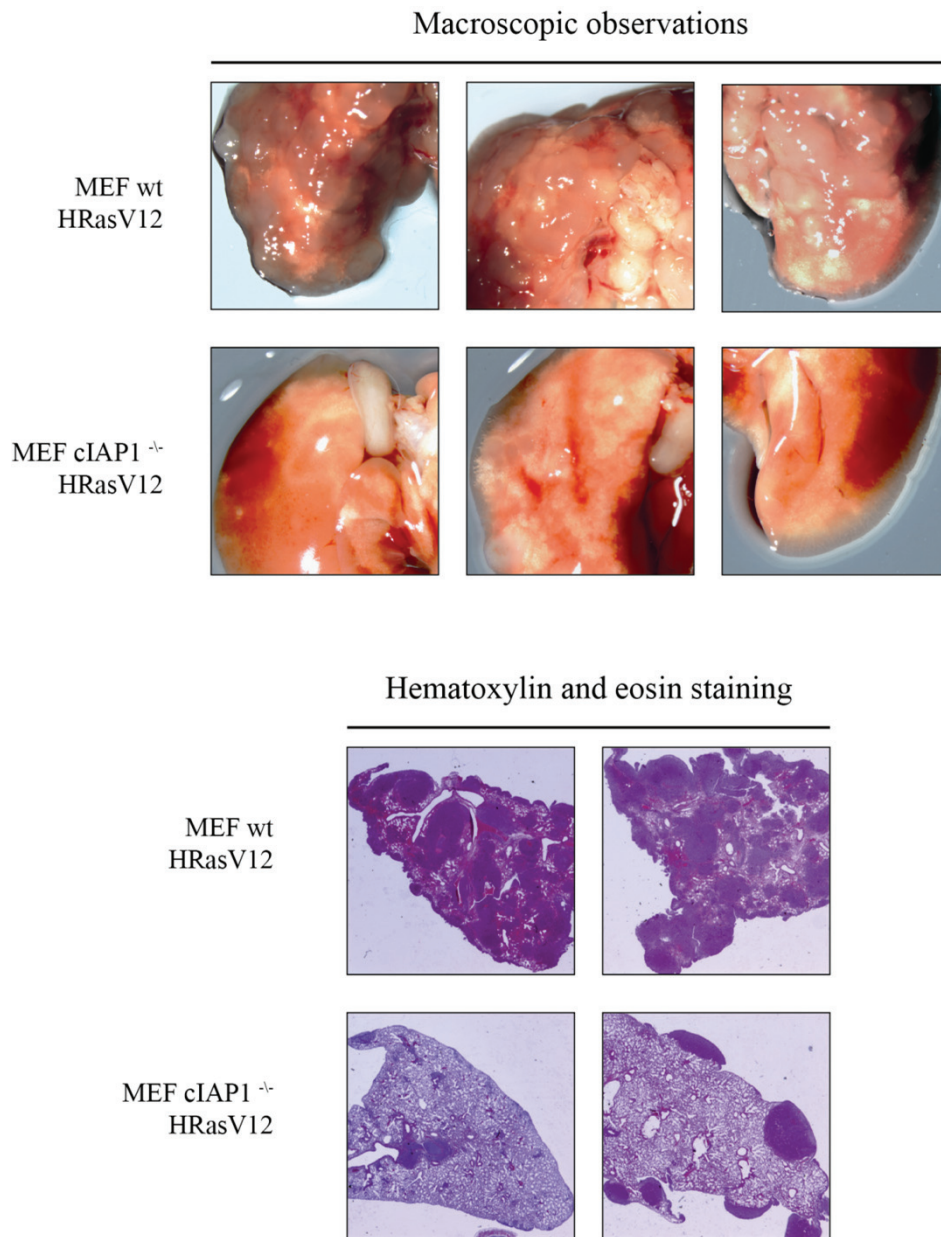
**Figure S6.** HEK293T cells were transfected with GFP, GFP-cIAP1 or GFP-cIAP1<sup>L47A</sup> (GFP-L47A). GFP-IAP constructs were Immunoprecipitated using anti-GFP antibody and interactions were revealed by immunoblotting using anti-cIAP1 antibody detecting the overexpressed constructs and endogenous cIAP1.

### Supplementary Figure 7



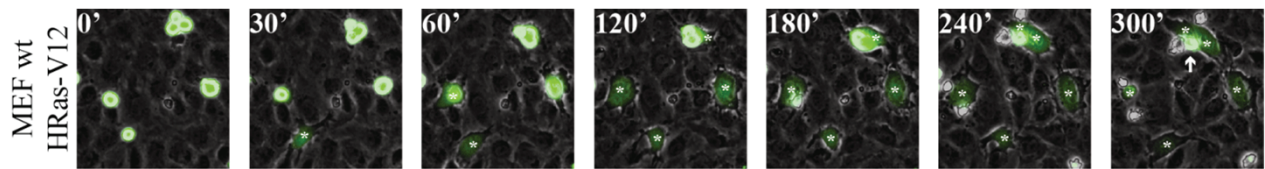
**Figure S7.** MEFs from wt or cIAP1<sup>-/-</sup> mice were transfected or silenced as in Figure 5C-E, serum starved, and treated for 10 minutes with 100ng/mL EGF. Filopodia were evaluated by a Microscopic analysis of F-actin immunostained using AlexaFluor488-conjugated Phalloidin and counted. > 100 cells were analyzed. Mean  $\pm$  sd of three independent experiments. Statistical analysis performed using the Student's *t*-test. \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

## Supplementary Figure 8



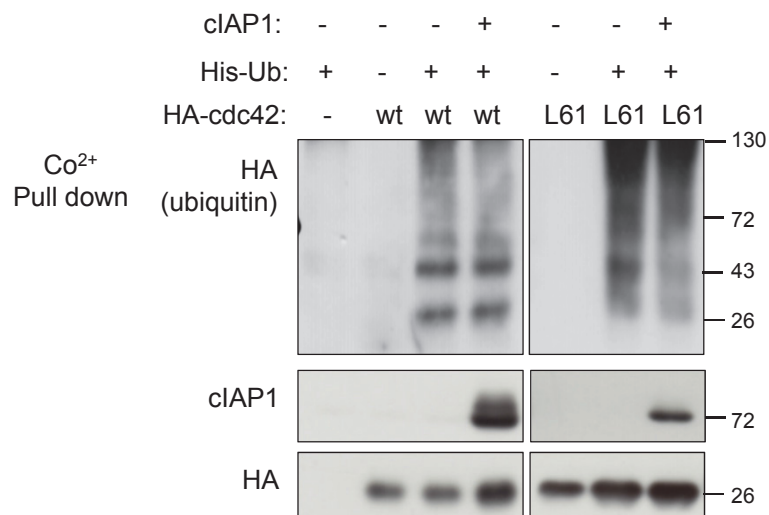
**Figure S8.** Nude mice were injected in the tail vein with  $1 \cdot 10^6$  MEF wt or cIAP1<sup>-/-</sup> expressing Hras-V12 and the mice were sacrificed 2 weeks later. Pictures of the whole lungs (upper panel) or lung sections stained with hematoxylin and eosin (lower panel) are presented.

### Supplementary Figure 9



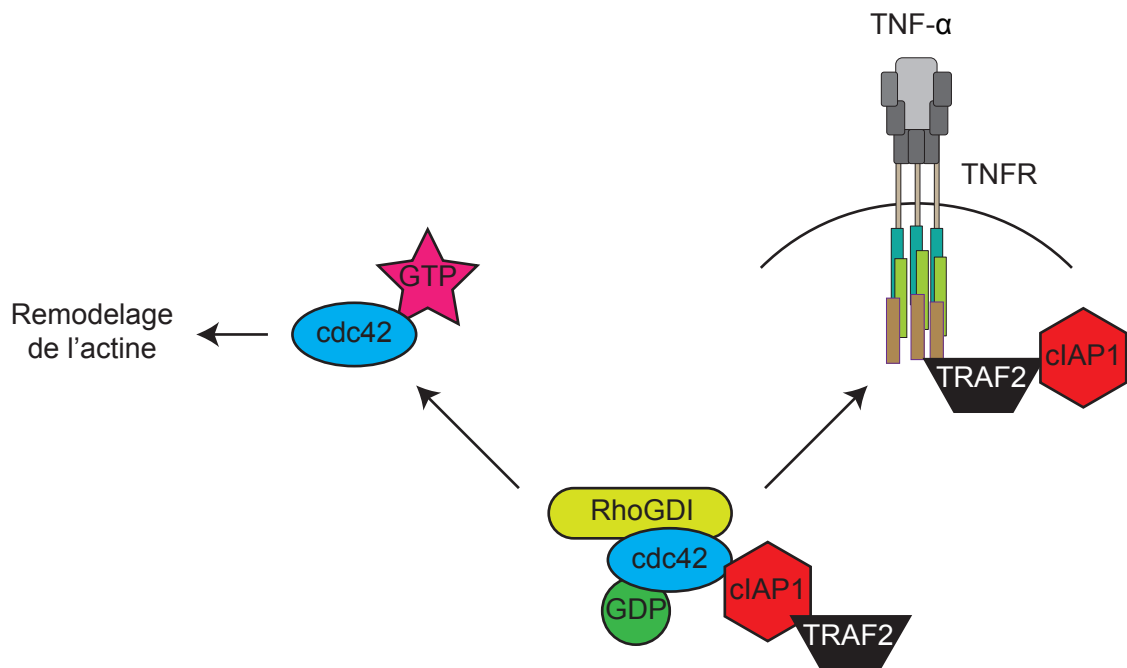
**Figure S9.** CFSE-labeled wt MEFs expressing HRas-V12 were added onto confluent HUVECs and filmed for 300 min. by time-lapse microscopy (picture every 15 min.) The intercalated cells that display a non-round shape and a low phase-bright were marked with an Asterisk. The arrow indicates the cell that did not intercalate

## Supplementary Figure 10

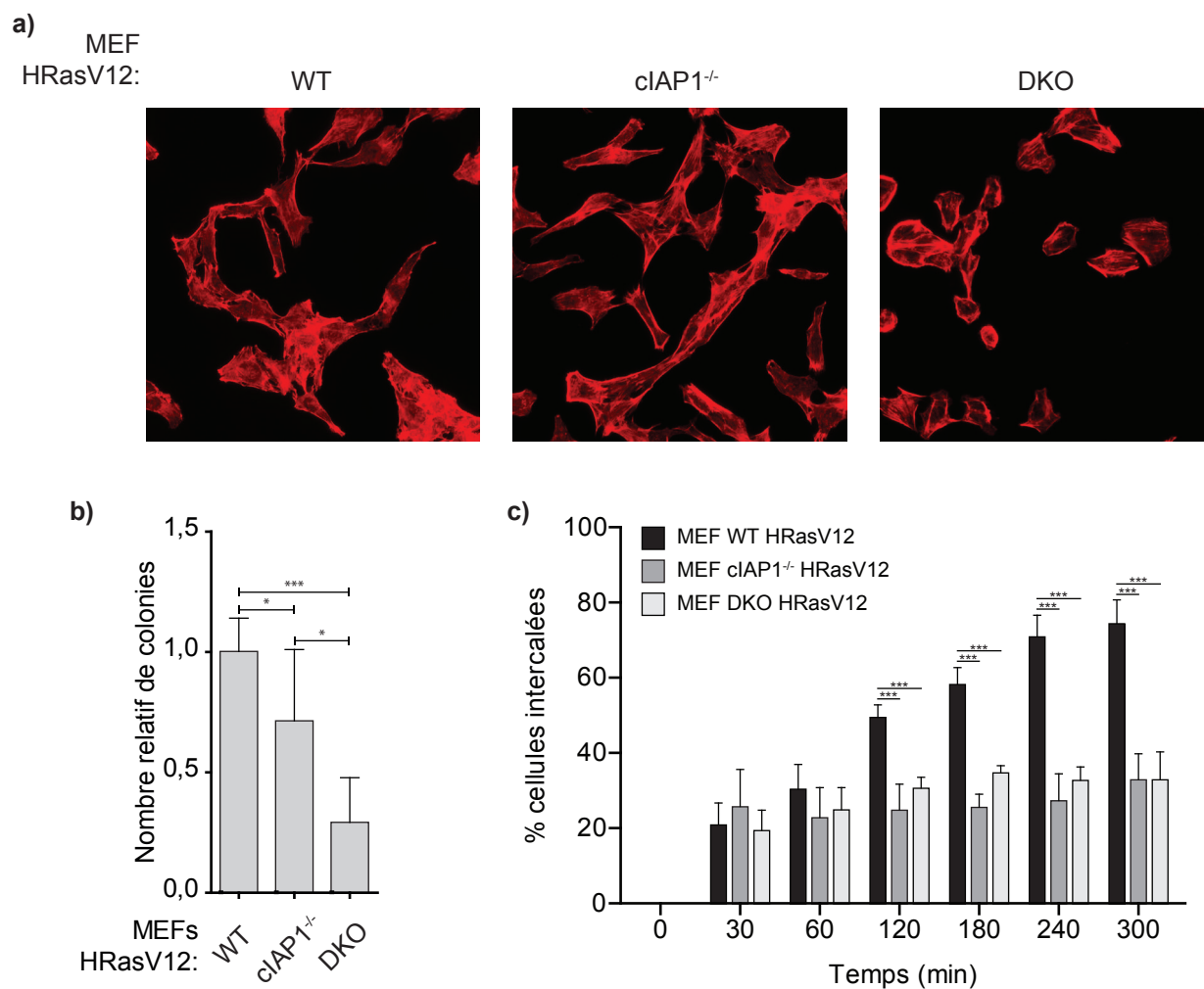


**Figure S10.** HEK293T were transfected with His-ubiquitin, HA-cdc42, HA-cdc42<sup>L61</sup> (L61) constitutive active mutant of cdc42 and cIAP1. His-ubiquitin was precipitated by using cobalt beads and ubiquitinated proteins were revealed by immunoblotting by using anti-HA specific antibody. The efficiency of transfection was checked by immunoblotting by using anti-cIAP1 and anti-HA antibodies.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence la régulation de cdc42 par cIAP1, et nous avons pu en déduire ce mode de fonctionnement :



**Figure 23 : cIAP1 régule l'activation de cdc42 et la formation de filipodes en réponse au TNF- $\alpha$ .** Le complexe cIAP1/TRAF2/cdc42/-RhoGDI stabilise la forme inactive liée au GDP de cdc42. Lors d'une stimulation par le TNF- $\alpha$ , cIAP1 et TRAF2 sont recrutés sur le récepteur TNFR, ainsi cdc42 va pouvoir s'activer en s'associant au GTP et induire le remodelage d'actine nécessaire à la formation de filipodes.



**Figure 24: Comparaison des MEF HRasV12 WT, cIAP1<sup>-/-</sup> et DKO.** (a) Marquage de l'actine des cellules à la phalloïdine et observation microscopique. (b) Croissance des cellules en milieu semi-solide comptage des colonies après 3 semaines de culture. (c) Expérience d'intercalation des cellules à travers une monocouche de cellules endothéliales (HUVEC).



#### IV) Un nouveau modèle cellulaire permettant l'étude des fonctions de cIAP1 importantes pour son oncogénicité.

##### A) Comparaison des cellules MEF HRasV12 WT, cIAP1<sup>-/-</sup> et DKO.

Pour la rédaction de l'article 2, nous avons développé un modèle de cellules MEF cIAP1<sup>-/-</sup> transformées par l'oncogène HRasV12. Nous nous sommes alors interrogés sur l'éventuel rôle de cIAP2 dans ces processus, et s'il existait une redondance de cIAP1 et cIAP2 dans la régulation de la transformation oncogénique par HRasV12. Nous avons alors décidé de travailler avec les cellules MEF cIAP1/cIAP2 double KO (MEF DKO) exprimant l'oncogène HRasV12.

Dans un premier temps, nous avons observé la morphologie des cellules par un marquage de l'actine par la phalloïdine couplée à l'AlexaFluor 568 (*Figure 24a*). Les cellules MEF cIAP1<sup>-/-</sup> ont une forme plus allongée que les WT, alors que les DKO sont beaucoup plus arrondies. Il semble donc que la déplétion simultanée de cIAP1 et de cIAP2 a un impact sur le réseau d'actine différent de la simple déplétion de cIAP1.

Ces cellules ont été cultivées en milieu semi-solide (*Figure 24b*), et dans ces conditions, les cellules cIAP1<sup>-/-</sup> forment moins de colonies que les WT mais les DKO en forment beaucoup moins. Dans ce contexte, la déplétion combinée de cIAP1 et cIAP2 amplifie donc l'inhibition de la transformation oncogénique par HRasV12.

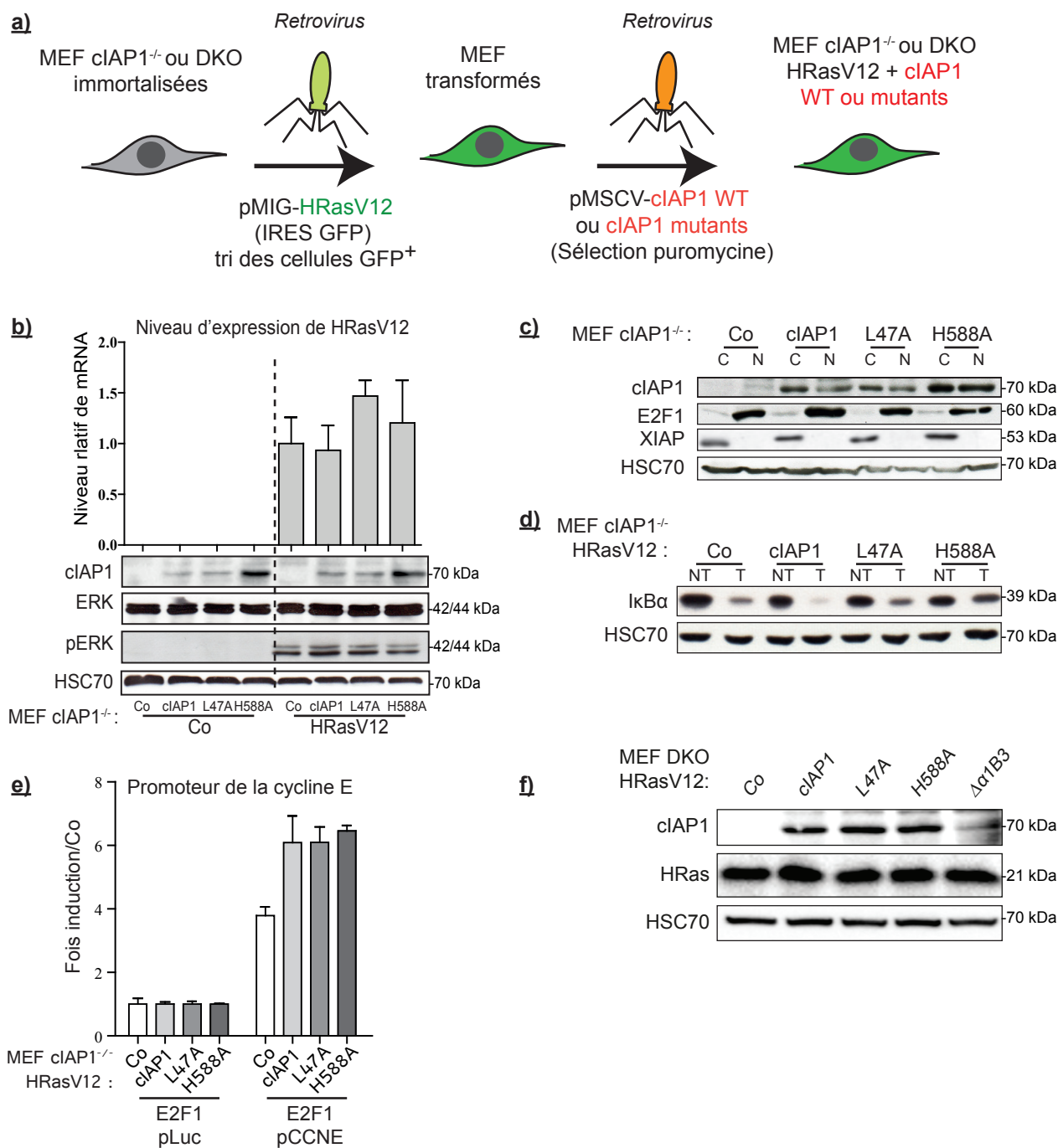
La capacité des cellules à s'intercaler dans une monocouche de cellules endothéliales HUVEC a ensuite été évaluée (*Figure 24c*). La déplétion de cIAP1 abolit la capacité des cellules à s'intercaler, il en est de même lorsque cIAP1 et cIAP2 sont absents.

Ces observations nous ont permis de conclure que la déplétion simultanée de cIAP1 et de cIAP2 était plus efficace que le simple KO cIAP1 dans l'inhibition de la transformation oncogénique par cIAP1.

##### B) Restauration de l'expression de cIAP1 WT ou de ses mutants dans les MEFs cIAP1<sup>-/-</sup> ou DKO.

Nous avons ensuite voulu aller plus loin dans l'étude de ces mécanismes. L'expression de cIAP1 ou de ses différents mutants a été restaurée dans les cellules cIAP1<sup>-/-</sup> transformées par l'oncogène HRasV12

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps infecté des cellules MEF cIAP1<sup>-/-</sup> avec un rétrovirus codant pour HRasV12 et la GFP, et avons alors trié les cellules exprimant la GFP. Sur ces cellules, nous avons ensuite réalisé une deuxième infection avec un rétrovirus codant pour cIAP1 WT ou des mutants de cIAP1 ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine. Après sélection, nous avons donc obtenu des clones MEF cIAP1<sup>-/-</sup> HRasV12 restaurées pour cIAP1 WT ou mutant (*Figure 25a*).



**Figure 25 : Caractérisation in vitro des MEF HRasV12 restaurées par cIAP1 WT, L47A, H588A ou Δα1B3.** (a) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour l'obtention de co modèle. (b) Contrôle du niveau d'expression de cIAP1, ERK, ERK phosphorylé (pERK) dans les cellules par immuno-empreinte. HSC70 est utilisé comme contrôle de charge. Le niveau d'expression de HRasV12 est contrôlé par RT-qPCR. (c) Fractionnement subcellulaire des cellules avec la fraction cytosolique (C) et la fraction nucléaire (N). E2F1 est utilisé comme contrôle de pureté de la fraction cytosolique et XIAP de la fraction nucléaire. HSC70 est utilisé comme contrôle de charge. (d) Les cellules sont traitées 15 minutes par du TNF-α (T) ou non traitées (NT), la dégradation d'IκBα est contrôlée par immuno-empreinte. HSC70 est utilisé comme contrôle de charge. (e) Les cellules sont transfectées avec E2F1 et un plasmide luciférase contrôle (pLuc) ou un plasmide codant la luciférase sous le contrôle du promoteur de la Cycline E (pCCNE). Les résultats sont présentés en fois induction par rapport au contrôle correspondant. (f) Contrôle du niveau d'expression de cIAP1 et de ses mutants par immuno-empreinte dans des cellules MEF DKO HRasV12 restaurées.

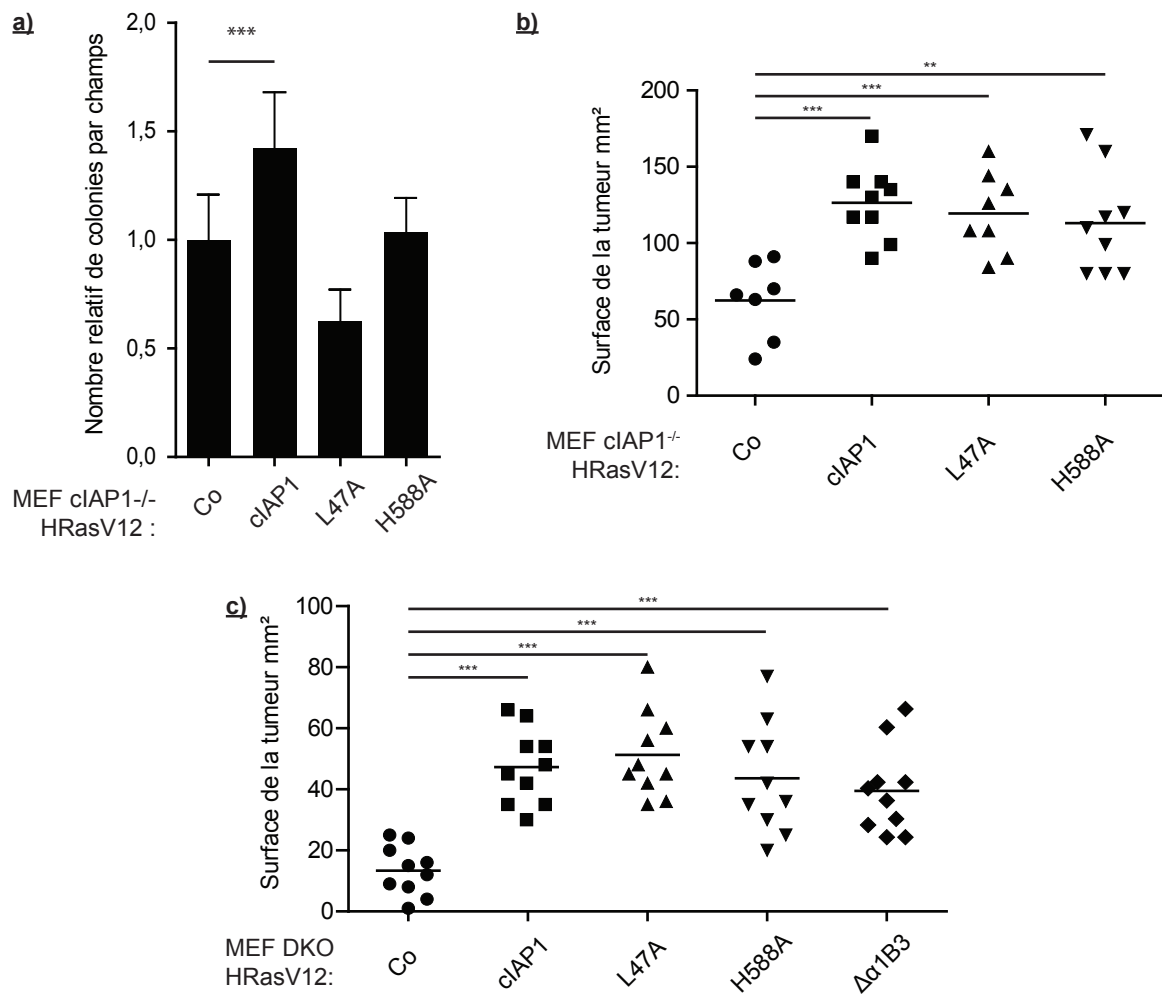
Nous avons exprimé dans les cellules le mutant L47A qui n'interagit plus avec TRAF2. Ce mutant n'a donc plus la possibilité d'être recruté dans les complexes des TNFR et de contrôler les voies de signalisation de ces récepteurs. Nous avons aussi exprimé le mutant H588A qui a perdu sa fonction E3 ubiquitine ligase. Comme cela est décrit dans « l'introduction » et la partie « résultats », ce mutant n'est plus capable de réguler les principales voies de signalisation.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé nos modèles cellulaires. Nous avons donc vérifié l'expression des différents mutants ainsi que celle de HRasV12 (*Figure 25b*). Une analyse par fractionnement sub-cellulaire de la localisation de cIAP1 a révélé une expression à la fois nucléaire et cytoplasmique de cIAP1 et de ses mutants (*Figure 25c*). Un niveau d'expression général plus élevé du mutant H588A est en accord avec la perte de sa fonction E3 ubiquitine ligase et donc une plus grande stabilité de la protéine. Nous avons également confirmé l'effet de HRasV12 en vérifiant le niveau de phosphorylation élevé de ERK dans ces cellules en accord avec l'activation constitutive de la voie MAPK (*Figure 25b*).

Afin de contrôler l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans ces cellules, nous les avons traitées quinze minutes avec 100 ng/ml de TNF- $\alpha$  et avons contrôlé la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (*Figure 25d*). Nous observons alors que cIAP1 WT active la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  en réponse au TNF, en accord avec une activation de NF $\kappa$ B alors que les mutants L47A et H588A en sont incapables ce qui concorde avec le blocage de cette voie de signalisation. Notons tout de même que dans les cellules non restaurées ou restaurées avec les mutants de cIAP1, il existe une dégradation résiduelle de I $\kappa$ B $\alpha$  en réponse au TNF qui peut être expliquée par la présence dans ces cellules de cIAP2 qui pourrait participer à la transmission du signal. Cette observation nous a encouragés à développer notre étude dans des MEF délétées à la fois pour cIAP1 et cIAP2.

Nous avons ensuite contrôlé l'effet de la restauration de cIAP1 ou des mutants sur l'activité de E2F1 par un test de gène rapporteur sur le promoteur de la Cycline E (*Figure 25e*). Sans surprise, aussi bien cIAP1 WT que les mutants sont capables de stimuler l'activité transcriptionnelle de E2F1 dans ces cellules.

Des clones de MEF DKO cIAP1<sup>-/-</sup>/cIAP2<sup>-/-</sup> exprimant HRas-V12 ont été obtenus comme précédemment. cIAP1 et les mutants L47A et H588A ont aussi été exprimés dans des MEF DKO HRasV12. De plus, nous avons exprimé le mutant cIAP1  $\Delta\alpha$ 1B3 qui a perdu sa capacité à interagir avec E2F1. Curieusement, le mutant  $\Delta\alpha$ 1B3 est très peu exprimé dans ces cellules (*Figure 25f*). Après avoir testé de multiples infections dans des conditions différentes, le même résultat a toujours été obtenu. Les résultats de Jennifer Allègre ont montré une grande instabilité de ce mutant qui est rapidement dégradé par le système du protéasome.



**Figure 26 : Evaluation des propriétés oncogéniques des cellules restaurées par cIAP1 WT ou ses mutants.** **a)** Croissance en milieu semi-solide. 5 000 cellules sont implantées dans un milieu contenant de l'agar mou, après 3 semaines de culture, le nombre de colonies par champs de microscope est compté. Le test statistique Mann-Whitney a été utilisé (\*\*P < 0,0001). **b)** et **c)** 1 million de cellules sont injectées par voie sous-cutanée chez la souris Nude, le volume des tumeurs est mesuré 18 jours après l'injection. Le test statistique Mann-Whitney a été utilisé.

### **C) Evaluation des propriétés oncogéniques des cellules restaurées par cIAP1 WT ou ses mutants.**

Après avoir caractérisé ces deux modèles cellulaires, nous avons voulu évaluer l'influence de la restauration de cIAP1 ou des mutants sur le caractère oncogénique de ces cellules. Un test de croissance en milieu semi-solide a été réalisé afin d'évaluer la croissance indépendante de l'adhésion de ces cellules (*Figure 26a*). Dans les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> HRasV12, l'expression de cIAP1 WT stimule la capacité des cellules à former des colonies dans un milieu de culture mou alors que les deux mutants L47A et H588A en sont incapables. Ceci pourrait être dû au blocage de la signalisation NF-κB dans ces cellules entraînant une production de cytokines altérée et une réduction de la capacité des cellules à proliférer dans ces conditions.

Lorsque ces cellules sont injectées par voie sous-cutanée chez la souris Nude (*Figure 26b*), cIAP1 stimule la croissance tumorale, ce qui confirme ses propriétés oncogéniques dans ce contexte. Nous avons alors été très surpris d'observer une stimulation de la croissance des tumeurs aussi bien par cIAP1 WT que par ses mutants. Ces résultats ne concordent pas avec les expériences de culture en milieu semi-solide et semblent indiquer que dans ce contexte, cIAP1 se comporte comme un oncogène indépendamment de la régulation de NF-κB. Il est d'autant plus remarquable de noter que même dépourvu de sa fonction E3 ubiquitine ligase (mutant H588A), cIAP1 conserve sa capacité à stimuler la croissance des tumeurs.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons injecté les cellules MEF DKO HRasV12 restaurées. Nous obtenons alors les mêmes résultats bien que les tumeurs grandissent moins vite qu'avec les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> (*Figure 26c*) ce qui est en accord avec la réduction de leur propriétés oncogéniques (*Figure 24*), confirmant le caractère oncogénique des mutants de cIAP1 incapables de réguler NF-κB. Le mutant Δα1B3, malgré la perte d'interaction avec E2F1 et son faible niveau d'expression, est également capable de favoriser la croissance tumorale.

### **D) Conclusion**

Ce travail a permis la mise au point d'un modèle d'analyse de l'activité oncogénique de cIAP1. cIAP1 est capable de stimuler la croissance de tumeurs sous-cutanées dans un modèle de xénogreffe chez la souris, et ceci indépendamment de son activité E3 ubiquitine ligase, de sa capacité à lier TRAF2 ou E2F1. Il est fort probable que l'ensemble de ces activités soit responsable de son activité oncogénique et que l'inhibition d'une seule de ces fonctions soit insuffisante pour abolir cette activité. J'ai initié ce travail durant ma quatrième année de thèse. Ce travail est poursuivi par Jennifer Allègre actuellement en deuxième année de thèse. Elle continue la caractérisation des cellules avec l'étude de voies de signalisation très importantes dans ce contexte comme la voie MAPK. Elle continue également la recherche d'un mutant de cIAP1 incapable d'interagir avec E2F1 mais avec une stabilité comparable à la protéine sauvage. Enfin, une analyse du profil de sécrétion cytokinique des lignées cellulaires est envisagée. Des

expériences d'injection des cellules dans la veine caudale des souris afin de générer des foyers tumoraux dans les poumons des animaux sont en cours. Il serait alors très intéressant d'observer des différences entre les mutants selon s'il s'agit de croissance sous-cutanée ou de modèle métastatique.

De nouveaux mutants de cIAP1 ont été clonés, il s'agit de délétion spécifique des domaines BIR. Nous possédons les mutants  $\Delta$ BIR1,  $\Delta$ BIR2 et  $\Delta$ BIR3. Ces mutants plus larges et moins spécifiques nous permettront de confirmer nos résultats. De plus, nous savons que le mutant  $\Delta$ BIR2 n'interagit plus avec cdc42. Un tel mutant n'a pas encore été testé. Vu le rôle de cette interaction dans l'adhésion et l'intercalation des cellules dans un tapis de cellules endothéliales, ce mutant pourrait donner des résultats très intéressants dans une analyse du développement de nodules pulmonaires après injection intraveineuse des cellules.

# Discussion

## I) cIAP1 dans la signalisation du TNF- $\alpha$ .

Comme développé dans l'introduction, le rôle de cIAP1 dans la signalisation du TNF- $\alpha$  est maintenant très bien documenté et compris. Nous savons que cIAP1 peut orienter la réponse des cellules vers la survie et l'induction de l'inflammation ou au contraire vers la mort cellulaire, via la régulation de l'ubiquitination de ses partenaires au sein de plateformes multi-protéiques. Nous avons montré dans l'article 2 que cIAP1 contrôlait également les modifications du cytosquelette d'actine en réponse au TNF- $\alpha$ . En effet, cIAP1 est important pour l'activation de cdc42. Parmi les membres de la famille Rho, cdc42 a une activité spécifique, permettant la polarisation cellulaire et la formation de filopodes. La polarisation cellulaire est nécessaire durant les premières phases de la migration pour orienter le déplacement et les filopodes permettent aux cellules de sonder leur environnement et créent une zone de contact avec la matrice extracellulaire, ce qui est nécessaire à la migration. Cette activation de cdc42 par le TNF- $\alpha$  pourrait être importante pour le recrutement des cellules du système immunitaire sur le site de l'infection (Mathew, Haubert et al. 2009). Elle pourrait participer d'une part à la migration des cellules, et d'autre part, à l'arrêt de leur migration et leur recrutement sur le site d'infection. Nous n'avons pas été en mesure de montrer l'importance de cIAP1 dans le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection. Les expériences visant à analyser l'influence de cIAP1 sur la migration des MEF HRasV12 suivant un gradient de TNF- $\alpha$  n'ont pas pu être analysées due à une toxicité trop forte du TNF- $\alpha$  sur les cellules déficientes en cIAP1. Cependant, ce problème pourra être contourné par l'utilisation d'un mutant de cIAP1 ne pouvant plus interagir avec cdc42 (site d'interaction en cours d'analyse) mais conservant sa capacité à activer NF- $\kappa$ B et à inhiber la mort induite par le TNF- $\alpha$ . Nous avons montré que l'interaction de cIAP1 avec cdc42 se fait sur le BIR2 de cIAP1. Nous disposons pour le moment du mutant de cIAP1 délété de ce domaine BIR2. La recherche des sites d'interaction est en cours afin de réaliser un mutant plus spécifique. Ce mutant sera utilisé pour analyser les capacités migratoires de ces cellules ainsi que leur capacité à adhérer et à s'intercaler dans des cellules endothéliales. L'injection de ces cellules dans la veine caudale de souris permettra également de comparer leur invasion au niveau pulmonaire de l'animal en comparaison à celle de cellules exprimant la protéine WT.

## II) Les IAP dans la régulation des RhoGTPases et leur influence sur la migration cellulaire.

Le rôle des IAP dans la migration cellulaire a été analysé dans différentes études avec des résultats contradictoires. Des expériences de cicatrisation de lésion dans un tapis cellulaire (wound healing assay) ont révélé qu'une déplétion des IAP peut inhiber la migration des cellules dans plusieurs lignées de cellules tumorales (MDA-MB-231, MCF7, PC3, HeLa, HCT116) (Mehrotra, Languino et al. 2010, Liu, Zhang et al. 2011, Lopez, John et al. 2011). Cependant, la migration des fibroblastes (NIH3T3 ou MEF) est stimulée par une déplétion des IAP (Oberoi, Dogan et al. 2012).



Nous avons-nous même confirmé ces résultats dans les MEF  $\text{clAP1}^{-/-}$ . Dans un autre modèle de migration à travers un substrat (chambre de Boyden), une inhibition des IAP augmente la migration des cellules HeLa (Dogan, Harms et al. 2008, Oberoi, Dogan et al. 2011), vers la surface inférieure de la chambre de Boyden couverte de collagène de type I. Il apparaît donc que les IAP puissent avoir un rôle différent selon le type de migration et le type cellulaire. L'influence des IAP, notamment  $\text{clAP1}$ , sur des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, c-Myc, E2F1 pourrait expliquer cet effet. Par exemple l'activation de NF- $\kappa$ B peut conduire à la production de fibronectine favorisant la migration (Mehrotra, Languino et al. 2010). Les différents facteurs de transcription régulés par  $\text{clAP1}$  sont impliqués dans la production de nombreuses cytokines/chimiokines, de molécules d'adhésion, de récepteurs... Il est donc fortement probable que cette régulation de facteur de transcription par  $\text{clAP1}$  soit importante pour la migration cellulaire. L'effet migratoire de XIAP ainsi que  $\text{clAP1}$  et  $\text{clAP2}$  a aussi été expliqué par leur capacité de contrôler le niveau d'expression de c-RAF, un effecteur de RAS permettant l'activation de la voie MAPK, la migration et la prolifération (Dogan, Harms et al. 2008).

L'influence des IAP sur la migration cellulaire peut-être expliquée par leur activité régulatrice de l'homéostasie des RhoGTPases. En effet, l'activité migratoire des cellules nécessite un remodelage du réseau d'actine, sous la dépendance de ces GTPases. Lors de la migration, les différents membres de cette famille sont activés de façon séquentielle et coordonnée. Ceci implique la présence de mécanismes de régulation croisée. Le chaperon moléculaire RhoGDI participe à ces mécanismes de régulation. Nous avons montré une régulation de  $\text{cdc42}$  par  $\text{clAP1}$ . La liaison des IAP avec les autres membres des RhoGTPases a aussi été démontrée. XIAP et  $\text{clAP1}$  lient Rac1. Ils catalysent son ubiquitination et sa dégradation par le système du protéasome. L'interaction des IAP avec RhoA a été décrite plus récemment (Hornburger, Mayer et al. 2014). XIAP est importante pour l'activation de RhoA dans des cellules endothéliales en réponse à un traitement à la thrombine. L'interaction IAP-Rho semble un phénomène conservé, il a en effet aussi été retrouvé chez la drosophile (Geisbrecht and Montell 2004) et le poisson zèbre (Oberoi, Dogan et al. 2011). Dans tous les modèles, cette interaction est indépendante de l'état d'activation des Rho. L'activité des IAP sur les Rho semble différée d'une Rho à l'autre ; alors que XIAP induit l'ubiquitination et la dégradation de Rac1, aucune ubiquitination de  $\text{cdc42}$  et RhoA n'a été démontrée. Au contraire,  $\text{clAP1}$  semble stabiliser  $\text{cdc42}$  en favorisant son association avec RhoGDI.

### 1. Compétition pour RhoGDI

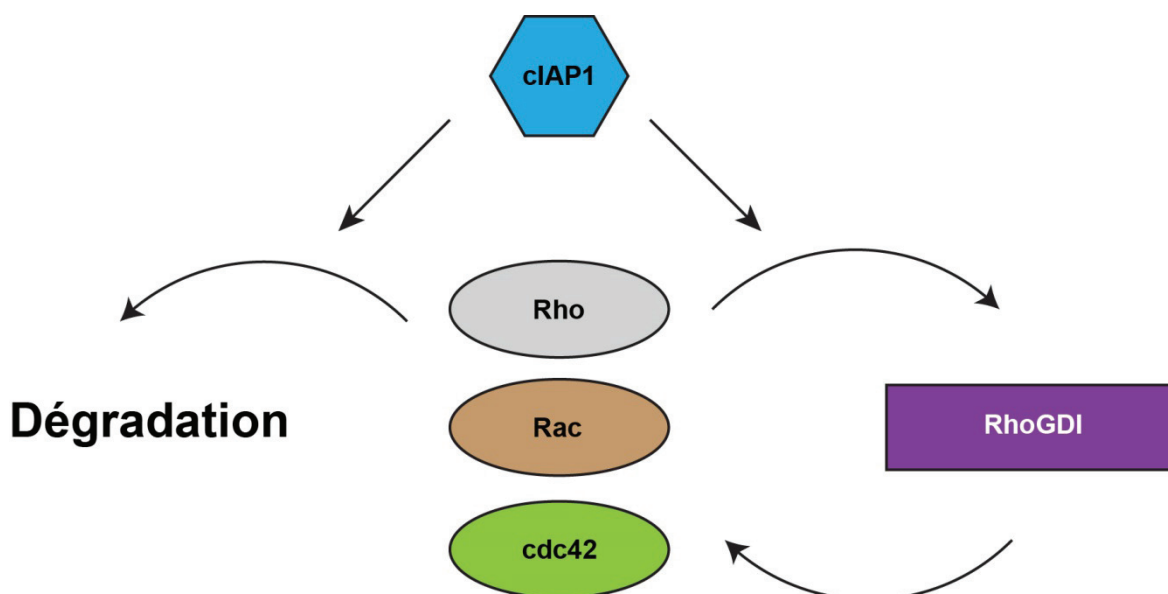
Il a en effet été montré que dans les cellules, les Rho sont soit associées à GDI, soit aux membranes (lieu de leur activation), sinon elles sont dégradées (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010). Or dans les cellules, le niveau total de RhoGDI est équivalent à la somme des niveaux totaux des trois principales RhoGTPases Rac1,  $\text{cdc42}$  et RhoA (Michaelson, Silletti et al. 2001) mettant en

évidence leur compétition pour leur stabilisation par RhoGDI. Ceci s'appuie sur l'observation que la surexpression d'une de ces Rho déplace cet équilibre en s'associant davantage avec RhoGDI, entraînant la dégradation des deux autres. La régulation de cdc42 par cIAP1 s'intègre parfaitement dans ce schéma puisqu'il favorise à la fois l'association de cdc42 avec RhoGDI et sa stabilisation tout en dégradant Rac (*Figure 27*). L'interaction directe de XIAP avec RhoGDI a également été décrite avec d'importantes conséquences sur son activité (Liu, Zhang et al. 2011). Il est alors possible d'imaginer que l'interaction spécifique des IAP avec les RhoGTPases participe activement à leur homéostasie, leur stabilité et impacte donc leur cycle d'activation, dégradation. Ce rôle central de cIAP1 et plus généralement des IAP dans la régulation des RhoGTPases ouvre alors des perspectives d'études passionnantes, laissant supposer que les IAP individuellement sont capables de faire basculer le fragile équilibre existant entre les différentes RhoGTPases d'un côté ou d'un autre, impactant des mécanismes alors fondamentaux dans les capacités migratoires et invasives des cellules.

Les différentes IAP pourraient avoir des effets différents et spécifiques sur les RhoGTPases. Nos résultats indiquent que cIAP1 interagit préférentiellement avec cdc42 (en comparaison avec RhoA et Rac1). De plus la diminution d'expression de cIAP1 dans les MEF ou les NIH3T3 diminue le niveau de cdc42 sans affecter les niveaux de Rac1 et RhoA. Par contre, XIAP semble lier préférentiellement RhoA (Hornburger, Mayer et al. 2014).

Ceci est également appuyé par les différences morphologiques importantes des MEF délétées pour les IAP. En effet, la délétion de XIAP induit une morphologie filiforme des cellules (Oberoi, Dogan et al. 2011). Cette effet est plus marqué lors de la délétion de cIAP1, alors que la délétion simultanée de cIAP1 et cIAP2 entraîne une morphologie cellulaire bien plus arrondie (*Résultats, Figure 24a*).

La spécificité à la fois de la RhoGTPase régulée et de la IAP impliquée explique la difficulté rencontrée pour trouver un rôle clair des IAP dans la régulation des protéines Rho. A cela s'ajoute également la différence des mécanismes moléculaires impliqués et leur conséquence (interaction, ubiquitination, stabilisation, dégradation, modulation de l'activité).



**Figure 27 : Compétition des RhoGTPases pour la fixation à RhoGDI ou leur dégradation et l'influence de cIAP1.**

## 2. L'ubiquitination des RhoGTPases par les IAP.

L'ubiquitination des RhoGTPases par les IAP est un phénomène décrit mais qui cependant présente des contradictions. Dans l'étude d'Oberoi et al., les auteurs montrent que la déplétion des IAP inhibe la polyubiquitination dégradative de Rac1 observée en réponse à la toxine bactérienne CNF1 (Doye, Mettouchi et al. 2002) ou la diminution d'expression de RhoGDI (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010) suggérant que les IAP sont les E3 ubiquitine ligases responsables de ce phénomène (Oberoi, Dogan et al. 2012). Pourtant, une étude menée en 2011 avait identifié HACE1 (HECT domain and Ankyrin repeat Containing E3 ubiquitin ligase 1) comme la E3 ubiquitine ligase catalysant la polyubiquitination de Rac1 (Torrino, Visvikis et al. 2011). Une analyse de cellules délétées pour la E3 ubiquitine ligase Smurf1 a démontré l'importance de cette protéine pour l'ubiquitination de RhoA. Les auteurs ont ensuite montré dans des cellules humaines primaires que la diminution d'expression de Smurf1 réduisait l'ubiquitination à la fois de RhoA, Rac1 et cdc42. En revanche, dans des lignées cancéreuses, selon le type cellulaire étudié, la diminution d'expression de Smurf1 inhibait spécifiquement l'ubiquitination de RhoA, de Rac1 ou de cdc42, montrant que l'ubiquitination des RhoGTPases est extrêmement variable selon le type cellulaire étudié (Boyer, Turchi et al. 2006). Il semble alors que le niveau d'expression des E3 ubiquitines ligases et leur disponibilité influencent le mode d'ubiquitination des RhoGTPases. Il existe d'importantes différences d'expression des IAP selon le type cellulaire, leur changement de compartiment cellulaire (cIAP1 nucléaire) et la modulation de leur niveau d'expression en réponse à différents stimuli, il est alors possible de comprendre comment les IAP peuvent avoir des rôles opposés sur la migration cellulaires selon le modèle utilisé.

### **III) Régulation de E2F1 par cIAP1.**

#### **A) Interaction cIAP1 /E2F1.**

Nous avons également montré l'interaction de cIAP1 avec E2F1. Cette interaction se fait sur le domaine de liaison à l'ADN de E2F1 et la première hélice alpha du domaine BIR3 de cIAP1. Des études de mutagenèse dirigée sont actuellement en cours afin de déterminer précisément les résidus de cIAP1 importants pour cette interaction. Une première stratégie a été de dépléter complètement l'hélice alpha en question. Nous confirmons la perte d'interaction avec E2F1 et l'absence d'activation de son activité transcriptionnelle. Ce mutant de cIAP1 baptisé  $\Delta\alpha 1B3$  s'exprime dans les cellules lors d'expériences de surexpression transitoire, en revanche son niveau d'expression est faible lorsqu'il est stablement exprimé dans les cellules. Ceci semble être dû à une faible stabilité de la protéine et à son adressage au protéasome. Une étude a révélé l'importance du BIR3 dans la régulation de la stabilité de cIAP1 (Dueber, Schoeffler et al. 2011). Le BIR3 de cIAP1 avec son domaine CARD régule son activité E3 ubiquitine ligase et sa dimérisation. Un changement de structure de cIAP1 après fixation des smac mimetics sur le BIR3 est observé, permettant sa dimérisation et ainsi son activité E3 ubiquitine ligase et son auto-ubiquitination suivie de sa rapide dégradation. Il est alors possible d'imaginer que notre mutant  $\Delta\alpha 1B3$  n'est plus en mesure de réguler cette activité E3 ubiquitine ligase, ce qui expliquerait sa faible stabilité et son adressage au protéasome.

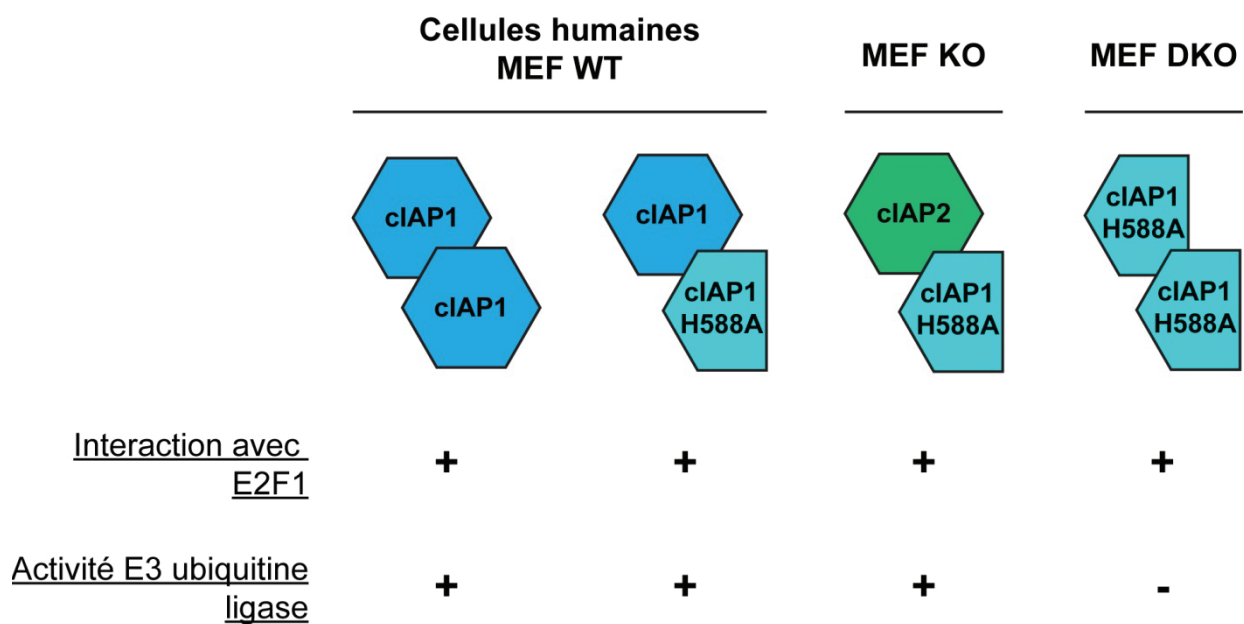
L'obtention d'un mutant ponctuel ayant perdu son interaction avec E2F1 et gardant une stabilité équivalente à la protéine WT sera un outil de grande importance dans l'étude de l'influence de cIAP1 sur E2F1.

#### **B) La fonction E3 ubiquitine ligase de cIAP1.**

La régulation de E2F1 par cIAP1 telle que nous l'avons décrite est indépendante de son activité E3 ubiquitine ligase, ce qui est étonnant si l'on compare cela aux fonctions historiques de cIAP1 dans lesquels cette fonction E3 ubiquitine ligase est centrale. Nous avons cependant récemment remis cette observation en question. En effet, nous avons démontré que E2F1 est une cible d'ubiquitination de cIAP1 et que cette ubiquitination est fonctionnelle, elle stabilise E2F1. Lorsque nous exprimons à la fois cIAP1 et E2F1 dans les cellules, nous observons d'une part l'ubiquitination de E2F1 mais également un niveau beaucoup plus élevé de E2F1, ce qui pourrait en partie expliquer l'effet que nous observons sur son activité. L'ubiquitination de E2F1 par cIAP1 étant associée à sa stabilisation, il s'agit sans doute plutôt d'une ubiquitination de type K63 que K48. Afin de vérifier cette hypothèse, il est possible d'utiliser dans les tests d'ubiquitination des molécules d'ubiquitine mutées sur les différentes lysines afin de déterminer le type d'ubiquitination mis en jeu.

Mais alors comment expliquer les résultats obtenus avec le mutant dépourvu d'activité E3 ubiquitine ligase et pourtant toujours capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de

E2F1 (cIAP1 H588A)? Notre hypothèse actuelle est basée sur la capacité des IAP à s'homodimériser (Dueber, Schoeffler et al. 2011, Lopez, John et al. 2011) et de s'hétérodimériser (Dohi, Okada et al. 2004, Silke, Kratina et al. 2005, Rajalingam, Sharma et al. 2006). Nous pensons en effet que cIAP1 H588A (dépourvu d'activité E3 ubiquitine ligase mais toujours capable de dimériser) s'homodimérise avec cIAP1 dans les cellules exprimant cIAP1 et s'hétérodimérise avec cIAP2 dans les cellules n'exprimant pas cIAP1 (MEF KO). Dans ce cas, les dimères formés permettent le changement de conformation nécessaire à l'activation du domaine RING de cIAP2 conférant ainsi au complexe une activité E3 ubiquitine ligase ainsi que l'exposition des sites d'interaction de cIAP1. Cette hypothèse est appuyée par nos récentes observations démontrant l'incapacité de cIAP1 H588A à stimuler l'activité transcriptionnelle de E2F1 dans les cellules cIAP1/2<sup>-/-DKO</sup> (MEF DKO). Afin de tester cette hypothèse, il est possible d'utiliser le mutant de cIAP1 dépourvu du domaine RING (cIAP1ΔRING), qui dans ce cas, a perdu son activité E3 ubiquitine ligase mais également son domaine de dimérisation. L'expression de ce mutant dans les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> permettra de valider notre hypothèse si contrairement au mutant H588A il est incapable de stimuler l'activité transcriptionnelle de E2F1.



**Figure 28 : Hypothèse sur les complexes formés par cIAP1 H588A et leur activité E3 ubiquitine ligase.**

Par ailleurs, l'activité de E2F1 est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles dont l'ubiquitination. Il est alors possible qu'en plus de stabiliser la protéine, l'ubiquitination de E2F1 change son motif d'interaction avec ses partenaires modifiant ses cibles transcriptionnelles. Nous avons en effet observé que selon le contexte cellulaire, cIAP1 pouvait réguler l'activité transcriptionnelle de E2F1 également sur des cibles pro-apoptotiques, il est alors possible que le statut d'ubiquitination de E2F1 impacte son profil transcriptionnel. Ceci est d'autant plus intéressant à étudier qu'il est connu que selon le type cellulaire, le contexte cellulaire, E2F1 peut stimuler l'induction de l'apoptose ou au contraire l'inhiber (Yuan, Yao et al. 2011). Ces

hypothèses sont actuellement testées par Valérie Glorian qui étudie l'influence de cIAP1 sur les modifications post-traductionnelles de E2F1 d'une manière générale ainsi que la caractérisation de l'ubiquitination de E2F1.

#### IV) Le rôle de cIAP1 dans le cancer.

##### A) La régulation de la signalisation cellulaire.

Comme développés dans la partie introduction, les rôles de cIAP1 dans le cancer sont multiples incluant une régulation des caspases et de nombreuses voies de signalisations cellulaires importantes pour l'inflammation, l'immunité, la survie des cellules ou l'induction de la mort cellulaire. Il contrôle entre autres la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au TNF- $\alpha$  telles que l'IL-8, IL-6, CXCL-1 et MCP-1 (Kearney, Sheridan et al. 2013). Nous n'avons pas contrôlé le niveau d'expression de ces cytokines dans nos cellules transformées par HRasV12 et restaurées pour différents mutants de cIAP1, mais ceci sera réalisé ainsi que l'évaluation de leur niveau d'expression au sein des tumeurs produites chez la souris. Bien que nos résultats indiquent que les fonctions de régulation de la signalisation cellulaire de cIAP1 ne sont pas indispensables à son activité oncogénique, le fait que les MEF DKO soient moins agressives que les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> et l'existence de cross-talk entre les différentes IAP laissent suggérer que ces fonctions peuvent tout de même être importantes et il ne serait alors pas étonnant d'observer des variations d'expressions de ces cytokines par les cellules.

Nous obtenons des résultats différents entre les expériences *in vitro* et *in vivo*. En effet, les cellules exprimant les mutants L47A et H588A forment autant de colonies dans un milieu semi-solide que les cellules n'exprimant pas cIAP1 alors que chez l'animal, ces mutants L47A et H588A stimulent la croissance tumorale de façon au moins équivalente à cIAP1. Une hypothèse pouvant expliquer ceci est la production de cytokines cytotoxiques dans le milieu de culture. En effet, les tests de croissance en milieu semi solide durent 3 semaines durant lesquelles du milieu frais est ajouté mais il est en revanche impossible de changer le milieu des cellules. Une production faible de TNF- $\alpha$  par une activation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B pourrait expliquer cela. Ceci ne serait pas toxique pour les cellules en culture car leur milieu est changé tous les deux jours. En revanche, une accumulation progressive de TNF- $\alpha$  dans le milieu semi-solide est possible, entraînant de la cytotoxicité. Cette hypothèse pourra être étudiée en mesurant le niveau d'expression du TNF- $\alpha$  dans les différentes cellules et en mesurant l'évolution du taux de TNF- $\alpha$  présent dans le milieu de culture à la fin des tests de clonogénicité.

##### B) Impact de la régulation de cdc42.

A ce stade, nous n'avons pas pu étudier l'impact de la régulation de cdc42 sur les propriétés oncogéniques de cIAP1. Pour ce faire, nous utiliserons le mutant cIAP1 $\Delta$ BIR2 en attendant un mutant plus « spécifique ». Les cellules sont actuellement en cours d'infection, les expériences seront rapidement réalisées et nous postulons que les cellules restaurées par cIAP1 $\Delta$ BIR2



n'auront pas les mêmes capacités invasives que les cellules restaurées par cIAP1 WT. Il est d'autant plus intéressant de noter que la déplétion de IAP dans les MEF augmente leur capacité de migration dans des expériences de cicatrisation de tapis cellulaire, une fonction qui n'est pas spécifique de cdc42, alors que nous avons également montré que les MEF cIAP1<sup>-/-</sup> et les MEF DKO sont incapables de s'intercaler dans une monocouche de cellules endothéliales, une fonction qui quant à elle est décrite comme spécifique de cdc42. Nous pouvons alors postuler que la régulation spécifique de cdc42 par cIAP1 est importante pour les capacités invasives des cellules MEF HRasV12.

### **C) Impact de la régulation de E2F1.**

Les expériences réalisées avec le mutant cIAP1Δα1B3 nous ont révélé que la régulation de E2F1 par cIAP1 dans ce contexte ne semble pas importante. Cependant ces résultats sont à mon sens à analyser avec prudence puisque le niveau d'expression de ce mutant est très bas et que nous ne savons pas exactement comment il se comporte dans les cellules. Nos résultats dans l'article 1 montrent une influence de cIAP1 sur le niveau d'expression des cyclines E et A et nous avons également montré l'influence de cIAP1 sur la régulation de cibles pro-apoptotiques de E2F1 comme les caspases-7 et -9. Il serait alors intéressant de contrôler le niveau d'expression de ces cibles dans les MEF DKO HRasV12 restaurées ou non par cIAP1 et ses mutants. Comme développé dans l'introduction, il a été montré dans un modèle de cancer mammaire p53<sup>-/-</sup> qu'une expression élevée de cIAP1 et cIAP2 est importante pour la tumorigénicité et que cette augmentation peut être dépendante de E2F1 lorsque l'expression de Rb est perdue (Cheng, Zhou et al. 2010). Cette étude met donc en évidence une sélection positive des cellules tumorales exprimant fortement cIAP et ayant perdu le contrôle de l'activité de E2F1. Dans ce contexte, il ne serait donc pas étonnant qu'une coopération des deux protéines existe pour le développement de l'oncogénicité des cellules. L'obtention d'un mutant de cIAP1 muté spécifiquement pour le site d'interaction avec E2F1 permettra de répondre à cette question.

### **D) Impact de cIAP1 sur la sénescence induite par Ras.**

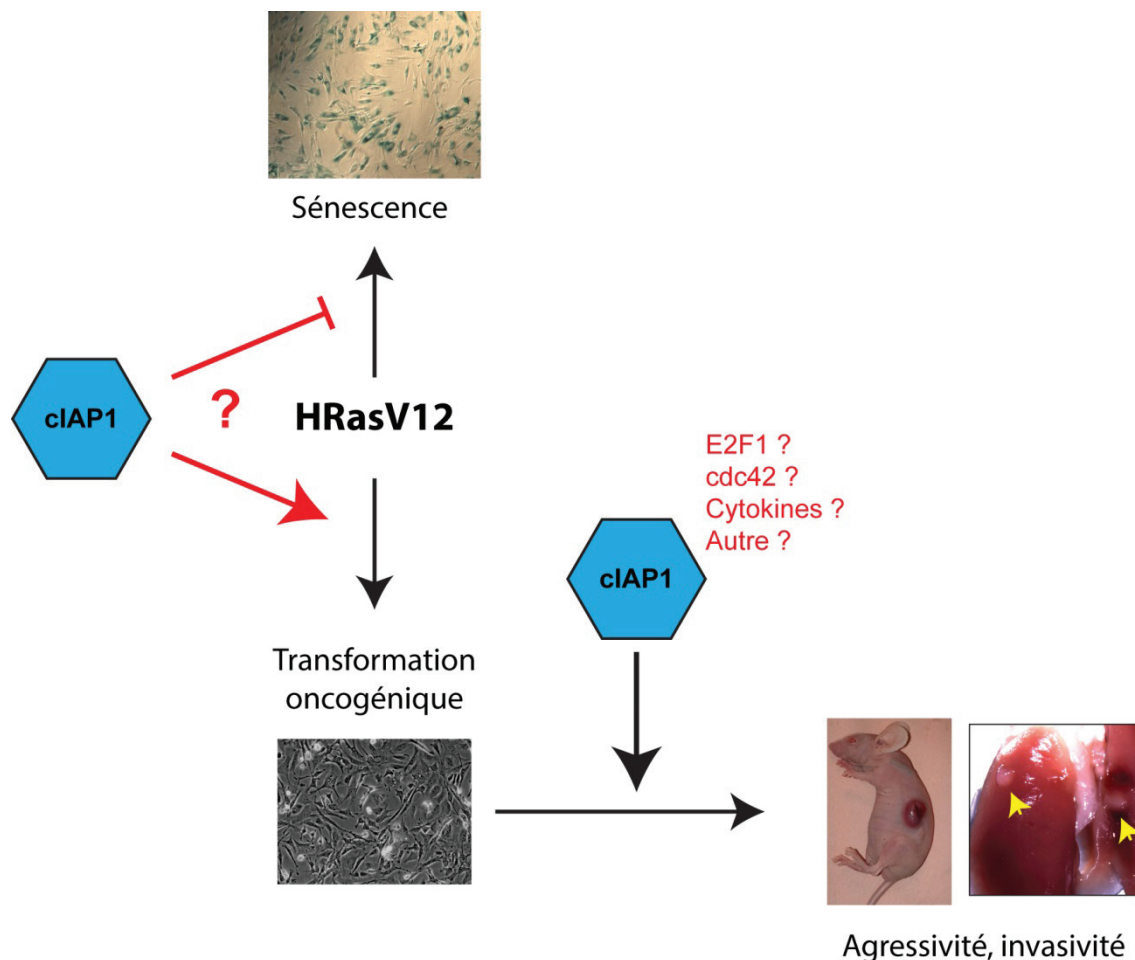
Il est fondamental de garder à l'esprit que nos travaux ont été réalisés dans des cellules immortalisées par l'antigène grand T du virus SV40, une protéine perturbant fortement les axes Rb et p53 protégeant ainsi les cellules de la sénescence induite par Ras (Ali and DeCaprio 2001). Se pose alors la question de l'influence de cIAP1 sur la transformation oncogénique par HRasV12 dans des cellules primaires. Comme développés dans la partie introduction, la sénescence induite par Ras repose sur trois axes principaux : la dérégulation des gènes E2F pro-prolifération, le déclenchement de la voie de réponse aux endommagements de l'ADN et la mise en place d'un profil sécrétoire particulier. Nous avons justement montré que cIAP1 avait un impact sur chacun de ces trois processus :

- Nous savons que cIAP1 peut activer l'activité transcriptionnelle de E2F1 sur ses gènes pro-prolifération, nous l'avons démontré pour la cycline E et la cycline A ainsi que l'influence de cIAP1 sur la prolifération des cellules. Nous avons d'ailleurs montré que ceci est aussi vrai dans les cellules épithéliales mammaires primaires HMEC. Dans ces cellules cIAP1 est fortement nucléaire et nous avons montré son recrutement sur les promoteurs des cibles E2F1 ainsi que son impact sur la prolifération cellulaire. Ces cellules sont connues pour déclencher la sénescence en réponse à l'expression de HRasV12, il serait alors intéressant d'étudier l'influence de la surexpression de cIAP1 ou de ses mutants sur l'induction de la sénescence de ces cellules. Il est peu probable que la simple surexpression de cIAP1 suffise à déjouer la sénescence dans ces cellules, mais il est en revanche possible que cette surexpression constitue un événement supplémentaire engageant la cellule vers une transformation complète.
- Nous savons également que cIAP1 influence la réponse à des endommagements de l'ADN, comme exposé dans la partie résultats, cIAP1 semble réguler la réponse de E2F1 en réponse à un traitement à l'étoposide et notamment la transcription de la caspase-7, mais ceci mérite d'être approfondi. Dans un contexte d'endommagement de l'ADN, plusieurs voies de régulation et fonctions de cIAP1 ont été décrites. Il a été montré une augmentation de la traduction de cIAP1 dépendante d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site) en réponse à des endommagements de l'ADN (Lewis and Holcik 2005). De plus, un complexe cytoplasmique composé de ATM-TRAF6-cIAP1 permet de créer un lien entre la réponse à des endommagements de l'ADN et l'activation de NF- $\kappa$ B (Hinz, Stilman et al. 2010). Une auto-ubiquitination suivie de sa dégradation a été décrite, permettant alors la formation du ripoptosome et l'induction de la mort cellulaire (Tenev, Bianchi et al. 2011). Il semble alors que dans un premier temps, un niveau élevé de cIAP1 permette de déclencher les voies de réparation de l'ADN et la survie des cellules et que lorsque les endommagements sont trop importants, la déplétion de cIAP1 entraîne le déclenchement de la mort cellulaire.
- Enfin, comme décrit précédemment, cIAP1 via la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires peut réguler la production de nombreuses chimiokines et cytokines comme l'IL-6 et IL-8 décrites comme importantes pour le maintien de la sénescence mais aussi pour la mise en place d'un environnement pro-tumoral (Introduction, IX, B).

Il est alors possible que, bien que nos mutants de cIAP1 ne présentent pas de différence de tumorigénicité au regard de la croissance tumorale dans les animaux, ceux-ci puissent présenter des différences d'efficacité dans le contournement de la sénescence lors d'une surexpression de HRasV12, ceci pourrait être étudié dans les cellules HMEC exprimant HRasV12.



Au-delà de la sénescence, nous savons que cIAP1 augmente l'agressivité et l'invasivité de cellules immortalisées transformées par HrasV12. Il apparaît alors qu'une expression élevée de cIAP1 associée à une mutation de HRas dans des échantillons tumoraux pourrait être un marqueur de mauvais pronostic. Il serait intéressant de corrélér l'expression des IAP avec les mutations de Ras dans le cancer. Les mutations de Ras sont importantes par exemple dans les cancers colorectaux, le cancer de la vessie et les carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (Lui, Hedberg et al. 2013), des cancers où l'expression nucléaire de cIAP1 est associée à un mauvais pronostic.



**Figure 29 : Influence de cIAP1 sur la transformation oncogénique par HRasV12.**

## V) cIAP1 comme cible thérapeutique.

La recherche intense dans le domaine des IAP a clairement établi un rôle important de ces protéines dans la tumorigénèse, de plus leur niveau d'expression ou leur localisation peuvent avoir une valeur pronostique. La particularité des IAP est la multitude des processus cellulaires cruciaux pour le développement de cancer qu'ils régulent. Au départ identifiés comme des inhibiteurs de l'apoptose par leur capacité à réguler les caspases, on sait désormais qu'ils contrôlent également la prolifération des cellules tumorales, leur capacité de survie, leur propriétés migratoires mais également la réponse inflammatoire qui contribue à la tumorigénèse et au contrôle de l'immunité.

Les IAP ont alors été désignés comme des cibles thérapeutiques de choix dans la lutte contre le cancer.

### A) Le développement des Smac mimetics.

Comme décrit dans l'introduction, l'analyse structurelle de l'interaction de XIAP avec les caspases ou son inhibiteur Smac a permis de développer des molécules mimant cette interaction et levant l'inhibition des caspases par XIAP, les Smac mimetics (SM). Les essais précliniques ont démontré leur efficacité dans la croissance de tumeurs solides ainsi que pour les leucémies lymphoblastiques aiguës et les myélomes multiples. Ils sensibilisent notamment les cellules à des traitements par TRAIL, des inhibiteurs du protéasome, les radiations, le melphalan et le cisplatine (Fulda and Vucic 2012). Ces composés sont bien tolérés par les animaux et ne présentent pas de toxicité particulière.

Plus de cinquante demandes de brevet en rapport avec les SM sont en cours d'étude et six molécules sont entrées dans les phases d'essais cliniques chez l'homme dans le traitement du cancer (Flygare and Fairbrother 2010).

### B) Mode d'action des Smac mimetics.

Les SM lèvent l'inhibition des caspases par XIAP augmentant ainsi l'activité des caspases-3 et 7. Cependant les SM sont également capables de fixer les domaines BIR de ML-IAP, cIAP1 et cIAP2. Ils augmentent l'activité E3 ubiquitine ligase des IAP entraînant l'ubiquitination de RIP1 et l'activation de la voie classique de NF- $\kappa$ B. Cette augmentation d'activité a également pour conséquence l'auto-ubiquitination de cIAP entraînant leur rapide dégradation. La dégradation de cIAPs bloque l'ubiquitination de NIK et active la voie alternative de NF- $\kappa$ B permettant la production de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  qui entraînera la mort cellulaire de manière autocrine. Comme décrit dans l'introduction, la déplétion de cIAP permet également d'entraîner la mort cellulaire avec la formation du ripoptosome (Pour revue (Dubrez, Berthelet et al. 2013)).

Le traitement par les SM entraîne également la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui pourrait entraîner une réponse immunitaire anti-tumorale (Emeagi, Van Lint et al. 2012).

### **C) Effets délétères des Smac mimetics.**

Des effets délétères d'un traitement par les SM ont été décrits :

- Chez le chien, l'injection intra-veineuse de SM entraîne une réponse inflammatoire aiguë associée à des dommages aux poumons et au foie correspondant à une toxicité au TNF- $\alpha$  (Erickson, Tarrant et al. 2013), des observations similaires mais moins sévères ont été faites chez le rat mais ne sont pas retrouvées chez l'homme.
- La différenciation des ostéoclastes et leur fonction sont dépendantes de l'activation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B et ces cellules sont sensibles au TNF- $\alpha$ . Une étude a montré qu'un traitement par les SM favorisait les métastases osseuses ainsi que l'ostéoporose (Yang, Davis et al. 2013).
- Il a également été montré dans des cellules de glioblastome que l'activation de la voie alternative de NF- $\kappa$ B induite par un traitement par des SM à des doses non toxiques conduisait à l'élongation des cellules et à l'augmentation de leur capacité de migration et d'invasion (Tchoghandjian, Jennewein et al. 2013).

Les SM offrent de nouvelles perspectives très encourageantes dans le traitement du cancer. Les premiers résultats des tests les présentent comme des molécules relativement bien tolérées avec des effets anti-tumoraux seuls ou en association avec d'autres chimiothérapies. Leur efficacité et leur tolérance vont continuer d'être évaluées dans les tests cliniques et la mise en place de protocoles, avec l'utilisation d'autres molécules ou traitements sera alors possible. Il faut cependant rester prudent au vu des bouleversements inflammatoires que peuvent entraîner l'utilisation de ces molécules. Nos travaux étudient des fonctions de cIAP1 encore très peu documentées mais cependant pertinentes dans un contexte tumoral. Il apparaît alors comme très intéressant d'approfondir l'étude de ces mécanismes et de les prendre en considération dans l'établissement de traitements ayant les IAP pour cibles thérapeutiques.

## VI) Conclusion – Perspectives.

Ce travail a permis d'étudier de nouvelles fonctions de cIAP1. Nous avons montré que cIAP1 régulait l'activité transcriptionnelle de E2F1, lui conférant une fonction de co-régulateur de ce facteur de transcription. Cette fonction est liée à la localisation nucléaire de cIAP1 et a une influence sur la transcription de gènes pro-prolifération mais également pro-apoptose selon le contexte cellulaire. Dans un second temps, nous avons montré que cIAP1 régulait l'activité de la RhoGTPase cdc42 et que cette régulation avait un impact sur la réponse des cellules à une stimulation par le TNF- $\alpha$  et le remaniement de leur cytosquelette d'actine. Cette régulation de cdc42 a un impact sur la motilité des cellules, leur orientation et leur migration.

Nous avons confirmé les propriétés oncogéniques de cIAP1 dans un modèle cellulaire de fibroblastes de souris (MEF) n'exprimant pas cIAP1, transformés par l'oncogène HRasV12. Dans ce contexte, cIAP1 stimule la croissance des cellules en milieu semi-solide, augmente l'adhésion et l'intercalation des cellules sur une monocouche de cellules endothéliales, augmente la croissance tumorale chez l'animal ainsi que l'invasion des poumons lorsque les cellules sont injectées dans la circulation sanguine des souris.

Nous n'avons pas encore établi de lien direct entre ces différentes fonctions de cIAP1 et leur impact sur les propriétés oncogéniques de cette protéine. En revanche, nous avons mis au point un modèle cellulaire basé sur la restauration de l'expression de cIAP1 WT ou muté spécifiquement pour ses fonctions connues dans des cellules MEF n'exprimant ni cIAP1 ni cIAP2 transformées par HRasV12. Les premiers résultats sont encourageants, ils démontrent des propriétés oncogéniques de cIAP1 WT mais également de mutants de cIAP1 ne régulant plus les voies de signalisation jusqu'alors considérées comme fondamentales pour son oncogénicité.

Les prochaines étapes de ce travail vont être l'étude des cellules restaurées par les différents mutants de cIAP1 et l'analyse de leur impact sur la signalisation cellulaire, la régulation du facteur de transcription E2F1, la régulation de cdc42 et du cytosquelette d'actine et l'évaluation de leurs propriétés oncogéniques afin de déterminer la part de chacune de ces fonctions dans la mise en place de l'oncogénicité de cIAP1.

La protéine cIAP1 et les protéines de la famille des IAP plus généralement sont aujourd'hui considérées comme des cibles thérapeutiques prometteuses dans la lutte contre le cancer. Des molécules antagonistes sont actuellement développées et en tests cliniques, la compréhension des mécanismes régulés par cIAP1, importants pour les cellules cancéreuses, présente par conséquent un grand intérêt pour le développement de nouveaux protocoles de traitement.

# **Bibliographie**

- Acosta, J. C., A. O'Loghlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando and J. Gil (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." Cell **133**(6): 1006-1018.
- Ahmed, S., W. I. Goh and W. Bu (2010). "I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation." Semin Cell Dev Biol **21**(4): 350-356.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach and J. C. Barrett (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-13747.
- Ali, S. H. and J. A. DeCaprio (2001). "Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins." Semin Cancer Biol **11**(1): 15-23.
- Alla, V., D. Engelmann, A. Niemetz, J. Pahnke, A. Schmidt, M. Kunz, S. Emmrich, M. Steder, D. Koczan and B. M. Putzer (2010). "E2F1 in melanoma progression and metastasis." J Natl Cancer Inst **102**(2): 127-133.
- Alonso, M. M., J. Fueyo, J. W. Shay, K. D. Aldape, H. Jiang, O. H. Lee, D. G. Johnson, J. Xu, Y. Kondo, T. Kanzawa, S. Kyo, B. N. Bekele, X. Zhou, J. Nigro, J. M. McDonald, W. K. Yung and C. Gomez-Manzano (2005). "Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance." J Natl Cancer Inst **97**(21): 1589-1600.
- Andrusiak, M. G., K. A. McClellan, D. Dugal-Tessier, L. M. Julian, S. P. Rodrigues, D. S. Park, T. E. Kennedy and R. S. Slack (2011). "Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration." Mol Cell Biol **31**(2): 238-247.
- Annunziata, C. M., R. E. Davis, Y. Demchenko, W. Bellamy, A. Gabrea, F. Zhan, G. Lenz, I. Hanamura, G. Wright, W. Xiao, S. Dave, E. M. Hurt, B. Tan, H. Zhao, O. Stephens, M. Santra, D. R. Williams, L. Dang, B. Barlogie, J. D. Shaughnessy, Jr., W. M. Kuehl and L. M. Staudt (2007). "Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma." Cancer Cell **12**(2): 115-130.
- Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A. P. Morel, B. P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, I. Puisieux, C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Voeltzel, A. Selmi, S. Valsesia-Wittmann, C. Caron de Fromental and A. Puisieux (2008). "Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence." Cancer Cell **14**(1): 79-89.
- Appledorn, D. M., K. H. Dao, S. O'Reilly, V. M. Maher and J. J. McCormick (2010). "Rac1 and Cdc42 are regulators of HRasV12-transformation and angiogenic factors in human fibroblasts." BMC Cancer **10**: 13.
- Ayala, I., M. Baldassarre, G. Caldieri and R. Buccione (2006). "Invadopodia: a guided tour." Eur J Cell Biol **85**(3-4): 159-164.
- Ayala, I., G. Giachetti, G. Caldieri, F. Attanasio, S. Mariggio, S. Tete, R. Polishchuk, V. Castronovo and R. Buccione (2009). "Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer." Cancer Res **69**(3): 747-752.
- Bashyam, M. D., R. Bair, Y. H. Kim, P. Wang, T. Hernandez-Boussard, C. A. Karikari, R. Tibshirani, A. Maitra and J. R. Pollack (2005). "Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer." Neoplasia **7**(6): 556-562.
- Beeser, A., Z. M. Jaffer, C. Hofmann and J. Chernoff (2005). "Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors." J Biol Chem **280**(44): 36609-36615.

- Berkovich, E. and D. Ginsberg (2003). "ATM is a target for positive regulation by E2F-1." Oncogene **22**(2): 161-167.
- Berthelet, J. and L. Dubrez (2013). "Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)." Cells **2**(1): 163-187.
- Bertrand, M. J., K. Doiron, K. Labbe, R. G. Korneluk, P. A. Barker and M. Saleh (2009). "Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2." Immunity **30**(6): 789-801.
- Bertrand, M. J., S. Lippens, A. Staes, B. Gilbert, R. Roelandt, J. De Medts, K. Gevaert, W. Declercq and P. Vandenabeele (2011). "cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4)." PLoS One **6**(9): e22356.
- Bertrand, M. J., S. Milutinovic, K. M. Dickson, W. C. Ho, A. Boudreault, J. Durkin, J. W. Gillard, J. B. Jaquith, S. J. Morris and P. A. Barker (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." Mol Cell **30**(6): 689-700.
- Beug, S. T., H. H. Cheung, E. C. LaCasse and R. G. Korneluk (2012). "Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis." Trends Immunol **33**(11): 535-545.
- Blankenship, J. W., E. Varfolomeev, T. Goncharov, A. V. Fedorova, D. S. Kirkpatrick, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, D. Arnott, M. Aghajan, K. Zobel, J. F. Bazan, W. J. Fairbrother, K. Deshayes and D. Vucic (2009). "Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1)." Biochem J **417**(1): 149-160.
- Boulter, E., R. Garcia-Mata, C. Guilluy, A. Dubash, G. Rossi, P. J. Brennwald and K. Burridge (2010). "Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1." Nat Cell Biol **12**(5): 477-483.
- Bouzahzah, B., C. Albanese, F. Ahmed, F. Pixley, M. P. Lisanti, J. D. Segall, J. Condeelis, D. Joyce, A. Minden, C. J. Der, A. Chan, M. Symons and R. G. Pestell (2001). "Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways." Mol Med **7**(12): 816-830.
- Boyer, L., L. Turchi, B. Desnues, A. Doye, G. Ponzio, J. L. Mege, M. Yamashita, Y. E. Zhang, J. Bertoglio, G. Flatau, P. Boquet and E. Lemichez (2006). "CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1-/- cells." Mol Biol Cell **17**(6): 2489-2497.
- Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito and K. Helin (2004). "E2F target genes: unraveling the biology." Trends Biochem Sci **29**(8): 409-417.
- Bracken, A. P., D. Kleine-Kohlbrecher, N. Dietrich, D. Pasini, G. Gargiulo, C. Beekman, K. Theilgaard-Monch, S. Minucci, B. T. Porse, J. C. Marine, K. H. Hansen and K. Helin (2007). "The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells." Genes Dev **21**(5): 525-530.
- Bramis, J., P. Zacharatos, I. Papaconstantinou, A. Kotsinas, F. Sigala, D. P. Korkolis, N. Nikiteas, A. Pazaiti, C. Kittas, E. Bastounis and V. G. Gorgoulis (2004). "E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas." Anticancer Res **24**(5A): 3041-3047.
- Bratton, S. B., G. Walker, S. M. Srinivasula, X. M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri and G. M. Cohen (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." EMBO J **20**(5): 998-1009.
- Breitsprecher, D., A. K. Kiesewetter, J. Linkner, M. Vinzenz, T. E. Stradal, J. V. Small, U. Curth, R. B. Dickinson and J. Faix (2011). "Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation." EMBO J **30**(3): 456-467.



- Broemer, M., T. Tenev, K. T. Rigbolt, S. Hempel, B. Blagoev, J. Silke, M. Ditzel and P. Meier (2010). "Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases." Mol Cell **40**(5): 810-822.
- Budhavarapu, V. N., E. D. White, C. S. Mahanic, L. Chen, F. T. Lin and W. C. Lin (2012). "Regulation of E2F1 by APC/C Cdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation." Cell Cycle **11**(10): 2030-2038.
- Bug, M. and M. Dobbelstein (2011). "Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms." Oncogene **30**(33): 3612-3624.
- Cam, H. and B. D. Dynlacht (2003). "Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication." Cancer Cell **3**(4): 311-316.
- Campisi, J. (1996). "Replicative senescence: an old lives' tale?" Cell **84**(4): 497-500.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-1321.
- Carnevale, J., O. Palander, L. A. Seifried and F. A. Dick (2012). "DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis." Mol Cell Biol **32**(5): 900-912.
- Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri and Y. Shi (2001). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." Cell **104**(5): 769-780.
- Chardin, P., J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler and D. Bar-Sagi (1993). "Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2." Science **260**(5112): 1338-1343.
- Chaussepied, M. and D. Ginsberg (2004). "Transcriptional regulation of AKT activation by E2F." Mol Cell **16**(5): 831-837.
- Che, X., D. Yang, H. Zong, J. Wang, X. Li, F. Chen, X. Chen and X. Song (2012). "Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients." Urol Oncol **30**(4): 450-456.
- Chen, F., L. Ma, M. C. Parrini, X. Mao, M. Lopez, C. Wu, P. W. Marks, L. Davidson, D. J. Kwiatkowski, T. Kirchhausen, S. H. Orkin, F. S. Rosen, B. J. Mayer, M. W. Kirschner and F. W. Alt (2000). "Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability." Curr Biol **10**(13): 758-765.
- Chen, L., T. H. Chan, Y. F. Yuan, L. Hu, J. Huang, S. Ma, J. Wang, S. S. Dong, K. H. Tang, D. Xie, Y. Li and X. Y. Guan (2010). "CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients." J Clin Invest **120**(4): 1178-1191.
- Chen, W. T. (1989). "Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells." J Exp Zool **251**(2): 167-185.
- Cheng, C. M., H. Li, S. Gasman, J. Huang, R. Schiff and E. C. Chang (2011). "Compartmentalized Ras proteins transform NIH 3T3 cells with different efficiencies." Mol Cell Biol **31**(5): 983-997.
- Cheng, L., Z. Zhou, A. Flesken-Nikitin, I. A. Toshkov, W. Wang, J. Camps, T. Ried and A. Y. Nikitin (2010). "Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency." Oncogene **29**(42): 5700-5711.
- Cheung, H. H., S. Plenchette, C. J. Kern, D. J. Mahoney and R. G. Korneluk (2008). "The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways." Mol Biol Cell **19**(7): 2729-2740.
- Cheung, L. W., P. C. Leung and A. S. Wong (2010). "Cadherin switching and activation of p120 catenin signaling are mediators of gonadotropin-releasing hormone to promote tumor cell migration and invasion in ovarian cancer." Oncogene **29**(16): 2427-2440.



- Choi, Y. E., M. Butterworth, S. Malladi, C. S. Duckett, G. M. Cohen and S. B. Bratton (2009). "The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing." *J Biol Chem* **284**(19): 12772-12782.
- Chong, J. L., P. L. Wenzel, M. T. Saenz-Robles, V. Nair, A. Ferrey, J. P. Hagan, Y. M. Gomez, N. Sharma, H. Z. Chen, M. Ouseph, S. H. Wang, P. Trikha, B. Culp, L. Mezache, D. J. Winton, O. J. Sansom, D. Chen, R. Bremner, P. G. Cantalupo, M. L. Robinson, J. M. Pipas and G. Leone (2009). "E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells." *Nature* **462**(7275): 930-934.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach and M. Serrano (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." *Nature* **436**(7051): 642.
- Connolly, P. F., R. Jager and H. O. Fearnhead (2014). "New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes." *Front Physiol* **5**: 149.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." *J Virol* **67**(4): 2168-2174.
- Cullen, K. and K. McCall (2004). "Role of programmed cell death in patterning the Drosophila antennal arista." *Dev Biol* **275**(1): 82-92.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-198.
- Dai, Z., W. G. Zhu, C. D. Morrison, R. M. Brena, D. J. Smiraglia, A. Raval, Y. Z. Wu, L. J. Rush, P. Ross, J. R. Molina, G. A. Otterson and C. Plass (2003). "A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes." *Hum Mol Genet* **12**(7): 791-801.
- Damgaard, R. B., U. Nachbur, M. Yabal, W. W. Wong, B. K. Fiil, M. Kastirr, E. Rieser, J. A. Rickard, A. Bankovacki, C. Peschel, J. Ruland, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, T. Kaufmann, A. Strasser, H. Walczak, J. Silke, P. J. Jost and M. Gyrd-Hansen (2012). "The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity." *Mol Cell* **46**(6): 746-758.
- Darding, M. and P. Meier (2012). "IAPs: guardians of RIPK1." *Cell Death Differ* **19**(1): 58-66.
- Dasgupta, P., W. Rizwani, S. Pillai, R. Davis, S. Banerjee, K. Hug, M. Lloyd, D. Coppola, E. Haura and S. P. Chellappan (2011). "ARRB1-mediated regulation of E2F target genes in nicotine-induced growth of lung tumors." *J Natl Cancer Inst* **103**(4): 317-333.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* **91**(2): 231-241.
- Debidda, M., L. Wang, H. Zang, V. Poli and Y. Zheng (2005). "A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation." *J Biol Chem* **280**(17): 17275-17285.
- Declercq, W., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2009). "RIP kinases at the crossroads of cell death and survival." *Cell* **138**(2): 229-232.
- DeGregori, J. and D. G. Johnson (2006). "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis." *Curr Mol Med* **6**(7): 739-748.
- del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera and G. Nunez (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." *Science* **278**(5338): 687-689.
- Dempke, W. C. and V. Heinemann (2010). "Ras mutational status is a biomarker for resistance to EGFR inhibitors in colorectal carcinoma." *Anticancer Res* **30**(11): 4673-4677.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." *Nature* **388**(6639): 300-304.

- Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-2551.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci and F. d'Adda di Fagagna (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." Nature **444**(7119): 638-642.
- Didelot, C., D. Lanneau, M. Brunet, A. Bouchot, J. Cartier, A. Jacquiel, P. Ducoroy, S. Cathelin, N. Decolgne, G. Chiosis, L. Dubrez-Daloz, E. Solary and C. Garrido (2008). "Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation." Cell Death Differ **15**(5): 859-866.
- Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta and J. Campisi (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." Mol Cell Biol **20**(1): 273-285.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Ding, J., S. Huang, S. Wu, Y. Zhao, L. Liang, M. Yan, C. Ge, J. Yao, T. Chen, D. Wan, H. Wang, J. Gu, M. Yao, J. Li, H. Tu and X. He (2010). "Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIa." Nat Cell Biol **12**(4): 390-399.
- Docquier, A., P. O. Harmand, S. Fritsch, M. Chanrion, J. M. Darbon and V. Cavailles (2010). "The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes." Clin Cancer Res **16**(11): 2959-2970.
- Dogan, T., G. S. Harms, M. Hekman, C. Karreman, T. K. Oberoi, E. S. Alnemri, U. R. Rapp and K. Rajalingam (2008). "X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-Raf kinase and cell motility." Nat Cell Biol **10**(12): 1447-1455.
- Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed and D. C. Altieri (2004). "An IAP-IAP complex inhibits apoptosis." J Biol Chem **279**(33): 34087-34090.
- Dong, G., E. Loukinova, Z. Chen, L. Gangi, T. I. Chanturita, E. T. Liu and C. Van Waes (2001). "Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway." Cancer Res **61**(12): 4797-4808.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(1): 11-22.
- Doye, A., A. Mettouchi, G. Bossis, R. Clement, C. Buisson-Touati, G. Flatau, L. Gagnoux, M. Piechaczyk, P. Boquet and E. Lemichez (2002). "CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion." Cell **111**(4): 553-564.
- Dubrez-Daloz, L., A. Dupoux and J. Cartier (2008). "IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins." Cell Cycle **7**(8): 1036-1046.
- Dubrez, L., J. Berthelet and V. Glorian (2013). "IAP proteins as targets for drug development in oncology." Onco Targets Ther **9**: 1285-1304.
- Dueber, E. C., A. J. Schoeffler, A. Lingel, J. M. Elliott, A. V. Fedorova, A. M. Giannetti, K. Zobel, B. Maurer, E. Varfolomeev, P. Wu, H. J. Wallweber, S. G. Hymowitz, K. Deshayes, D. Vucic and W. J. Fairbrother (2011). "Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination." Science **334**(6054): 376-380.

- Dupoux, A., J. Cartier, S. Cathelin, R. Filomenko, E. Solary and L. Dubrez-Daloz (2009). "cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand." Blood **113**(1): 175-185.
- Durkin, M. E., B. Z. Yuan, X. Zhou, D. B. Zimonjic, D. R. Lowy, S. S. Thorgeirsson and N. C. Popescu (2007). "DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor." J Cell Mol Med **11**(5): 1185-1207.
- Dynek, J. N., T. Goncharov, E. C. Dueber, A. V. Fedorova, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, E. Helgason, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, D. S. Kirkpatrick and D. Vucic (2010). "c-IAP1 and Ubch5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling." EMBO J **29**(24): 4198-4209.
- Ebihara, Y., M. Miyamoto, T. Shichinohe, Y. Kawarada, Y. Cho, A. Fukunaga, S. Murakami, H. Uehara, H. Kaneko, H. Hashimoto, Y. Murakami, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo and H. Katoh (2004). "Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression." Dis Esophagus **17**(2): 150-154.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." J Biol Chem **281**(6): 3254-3260.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen and F. L. Scott (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**(10): 988-994.
- Emeagi, P. U., S. Van Lint, C. Goyvaerts, S. Maenhout, A. Cauwels, I. A. McNeish, T. Bos, C. Heirman, K. Thielemans, J. L. Aerts and K. Breckpot (2012). "Proinflammatory characteristics of SMAC/DIABLO-induced cell death in antitumor therapy." Cancer Res **72**(6): 1342-1352.
- Engelmann, D., D. Mayoli-Nussle, C. Mayrhofer, K. Furst, V. Alla, A. Stoll, A. Spitschak, K. Abshagen, B. Vollmar, S. Ran and B. M. Putzer (2013). "E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B." J Mol Cell Biol **5**(6): 391-403.
- Engelmann, D. and B. M. Putzer (2010). "Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance." Drug Resist Updat **13**(4-5): 119-131.
- Erickson, R. I., J. Tarrant, G. Cain, S. C. Lewin-Koh, N. Dybdal, H. Wong, E. Blackwood, K. West, R. Steigerwalt, M. Mamounas, J. A. Flygare, K. Amemiya, D. Dambach, W. J. Fairbrother and D. Diaz (2013). "Toxicity profile of small-molecule IAP antagonist GDC-0152 is linked to TNF-alpha pharmacology." Toxicol Sci **131**(1): 247-258.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." Cell **106**(4): 489-498.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." Nature **421**(6924): 753-756.
- Etienne-Manneville, S., J. B. Manneville, S. Nicholls, M. A. Ferenczi and A. Hall (2005). "Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization." J Cell Biol **170**(6): 895-901.
- Feltham, R., B. Bettjeman, R. Budhidarmo, P. D. Mace, S. Shirley, S. M. Condon, S. K. Chunduru, M. A. McKinlay, D. L. Vaux, J. Silke and C. L. Day (2011). "Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization." J Biol Chem **286**(19): 17015-17028.
- Feltham, R., M. Moulin, J. E. Vince, P. D. Mace, W. W. Wong, H. Anderton, C. L. Day, D. L. Vaux and J. Silke (2010). "Tumor necrosis factor (TNF) signaling, but not TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)-triggered cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) degradation, requires cIAP1 RING dimerization and E2 binding." J Biol Chem **285**(23): 17525-17536.

- Feoktistova, M., P. Geserick, B. Kellert, D. P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Hacker and M. Leverkus (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." Mol Cell **43**(3): 449-463.
- Fidyk, N., J. B. Wang and R. A. Cerione (2006). "Influencing cellular transformation by modulating the rates of GTP hydrolysis by Cdc42." Biochemistry **45**(25): 7750-7762.
- Fingas, C. D., B. R. Blechacz, R. L. Smoot, M. E. Guicciardi, J. Mott, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, A. E. Sirica and G. J. Gores (2010). "A smac mimetic reduces TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced invasion and metastasis of cholangiocarcinoma cells." Hepatology **52**(2): 550-561.
- Fleming, I. N., A. Gray and C. P. Downes (2000). "Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components." Biochem J **351**(Pt 1): 173-182.
- Flygare, J. A. and W. J. Fairbrother (2010). "Small-molecule pan-IAP antagonists: a patent review." Expert Opin Ther Pat **20**(2): 251-267.
- Friedl, P. and D. Gilmour (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 445-457.
- Fritz, G., C. Brachetti, F. Bahlmann, M. Schmidt and B. Kaina (2002). "Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters." Br J Cancer **87**(6): 635-644.
- Fritz, G., I. Just and B. Kaina (1999). "Rho GTPases are over-expressed in human tumors." Int J Cancer **81**(5): 682-687.
- Fulda, S. and D. Vucic (2012). "Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer." Nat Rev Drug Discov **11**(2): 109-124.
- Gadea, G., V. Sanz-Moreno, A. Self, A. Godi and C. J. Marshall (2008). "DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells." Curr Biol **18**(19): 1456-1465.
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J. F. Marshall, K. Harrington and E. Sahai (2007). "Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells." Nat Cell Biol **9**(12): 1392-1400.
- Garcia-Mata, R., E. Boulter and K. Burridge (2011). "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 493-504.
- Gardam, S., V. M. Turner, H. Anderton, S. Limaye, A. Basten, F. Koentgen, D. L. Vaux, J. Silke and R. Brink (2011). "Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response." Blood **117**(15): 4041-4051.
- Garvalov, B. K., K. C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, X. Wu, C. Brakebusch, J. R. Bamburg and F. Bradke (2007). "Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity." J Neurosci **27**(48): 13117-13129.
- Geisbrecht, E. R. and D. J. Montell (2004). "A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration." Cell **118**(1): 111-125.
- Gerlach, B., S. M. Cordier, A. C. Schmukle, C. H. Emmerich, E. Rieser, T. L. Haas, A. I. Webb, J. A. Rickard, H. Anderton, W. W. Wong, U. Nachbur, L. Gangoda, U. Warnken, A. W. Purcell, J. Silke and H. Walczak (2011). "Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling." Nature **471**(7340): 591-596.
- Geserick, P., M. Hupe, M. Moulin, W. W. Wong, M. Feoktistova, B. Kellert, H. Gollnick, J. Silke and M. Leverkus (2009). "Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment." J Cell Biol **187**(7): 1037-1054.



- Gjoerup, O., J. Lukas, J. Bartek and B. M. Willumsen (1998). "Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation." *J Biol Chem* **273**(30): 18812-18818.
- Golks, A., D. Brenner, P. H. Krammer and I. N. Lavrik (2006). "The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation." *J Exp Med* **203**(5): 1295-1305.
- Gomez Del Pulgar, T., F. Valdes-Mora, E. Bandres, R. Perez-Palacios, C. Espina, P. Cejas, M. A. Garcia-Cabezas, M. Nistal, E. Casado, M. Gonzalez-Baron, J. Garcia-Foncillas and J. C. Lacal (2008). "Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism." *Int J Oncol* **33**(1): 185-193.
- Grzybowska-Izydorczyk, O., B. Cebula, T. Robak and P. Smolewski (2010). "Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia." *Eur J Cancer* **46**(4): 800-810.
- Gyrd-Hansen, M., M. Darding, M. Miasari, M. M. Santoro, L. Zender, W. Xue, T. Tenev, P. C. da Fonseca, M. Zvelebil, J. M. Bujnicki, S. Lowe, J. Silke and P. Meier (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." *Nat Cell Biol* **10**(11): 1309-1317.
- Gyrd-Hansen, M. and P. Meier (2010). "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 561-574.
- Haas, T. L., C. H. Emmerich, B. Gerlach, A. C. Schmukle, S. M. Cordier, E. Rieser, R. Feltham, J. Vince, U. Warnken, T. Wenger, R. Koschny, D. Komander, J. Silke and H. Walczak (2009). "Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction." *Mol Cell* **36**(5): 831-844.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* **279**(5350): 509-514.
- Hallstrom, T. C., S. Mori and J. R. Nevins (2008). "An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death." *Cancer Cell* **13**(1): 11-22.
- Hallstrom, T. C. and J. R. Nevins (2003). "Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10848-10853.
- Hamanaka, R. B., E. Bobrovnikova-Marjon, X. Ji, S. A. Liebhauer and J. A. Diehl (2009). "PERK-dependent regulation of IAP translation during ER stress." *Oncogene* **28**(6): 910-920.
- Hamann, M. J., C. M. Lubking, D. N. Luchini and D. D. Billadeau (2007). "Asef2 functions as a Cdc42 exchange factor and is stimulated by the release of an autoinhibitory module from a concealed C-terminal activation element." *Mol Cell Biol* **27**(4): 1380-1393.
- Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R. D. Mosteller, U. M. Krishna, J. R. Falck, M. A. White and D. Broek (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." *Science* **279**(5350): 558-560.
- Han, S., K. Park, B. N. Bae, K. H. Kim, H. J. Kim, Y. D. Kim and H. Y. Kim (2003). "E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide." *Breast Cancer Res Treat* **82**(1): 11-16.
- Hanada, N., H. W. Lo, C. P. Day, Y. Pan, Y. Nakajima and M. C. Hung (2006). "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor." *Mol Carcinog* **45**(1): 10-17.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harding, M. A. and D. Theodorescu (2010). "RhoGDI signaling provides targets for cancer therapy." *Eur J Cancer* **46**(7): 1252-1259.

- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). "NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions." Genes Dev **26**(3): 203-234.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-438.
- Heyworth, P. G., U. G. Knaus, J. Settleman, J. T. Curnutte and G. M. Bokoch (1993). "Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s)." Mol Biol Cell **4**(11): 1217-1223.
- Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-1170.
- Hinz, M., M. Stilmann, S. C. Arslan, K. K. Khanna, G. Dittmar and C. Scheidereit (2010). "A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation." Mol Cell **40**(1): 63-74.
- Hoffman, G. R., N. Nassar and R. A. Cerione (2000). "Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI." Cell **100**(3): 345-356.
- Hornburger, M. C., B. A. Mayer, S. Leonhardt, E. A. Willer, S. Zahler, A. Beyerle, K. Rajalingam, A. M. Vollmar and R. Furst (2014). "A novel role for inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as regulators of endothelial barrier function by mediating RhoA activation." FASEB J **28**(4): 1938-1946.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson and T. Hunter (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." J Biol Chem **275**(35): 26661-26664.
- Ianari, A., T. Natale, E. Calo, E. Ferretti, E. Alesse, I. Screpanti, K. Haigis, A. Gulino and J. A. Lees (2009). "Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein." Cancer Cell **15**(3): 184-194.
- Iden, S. and J. G. Collard (2008). "Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(11): 846-859.
- Ikeda, F., Y. L. Deribe, S. S. Skanland, B. Stieglitz, C. Grabbe, M. Franz-Wachtel, S. J. van Wijk, P. Goswami, V. Nagy, J. Terzic, F. Tokunaga, A. Androulidaki, T. Nakagawa, M. Pasparakis, K. Iwai, J. P. Sundberg, L. Schaefer, K. Rittinger, B. Macek and I. Dikic (2011). "SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis." Nature **471**(7340): 637-641.
- Imai, M. A., Y. Oda, M. Oda, I. Nakanishi and E. Kawahara (2004). "Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **130**(6): 320-326.
- Imoto, I., H. Tsuda, A. Hirasawa, M. Miura, M. Sakamoto, S. Hirohashi and J. Inazawa (2002). "Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy." Cancer Res **62**(17): 4860-4866.
- Imoto, I., Z. Q. Yang, A. Pimkhaokham, H. Tsuda, Y. Shimada, M. Imamura, M. Ohki and J. Inazawa (2001). "Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas." Cancer Res **61**(18): 6629-6634.
- Imre, G., S. Larisch and K. Rajalingam (2011). "Ripoptosome: a novel IAP-regulated cell death-signalling platform." J Mol Cell Biol **3**(6): 324-326.
- Jin, H. S., D. H. Lee, D. H. Kim, J. H. Chung, S. J. Lee and T. H. Lee (2009). "cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation." Cancer Res **69**(5): 1782-1791.

- Johnson, E., D. D. Seachrist, C. M. DeLeon-Rodriguez, K. L. Lozada, J. Miedler, F. W. Abdul-Karim and R. A. Keri (2010). "HER2/ErbB2-induced breast cancer cell migration and invasion require p120 catenin activation of Rac1 and Cdc42." J Biol Chem **285**(38): 29491-29501.
- Kaiser, W. J., J. W. Upton, A. B. Long, D. Livingston-Rosanoff, L. P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary and E. S. Mocarski (2011). "RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice." Nature **471**(7338): 368-372.
- Kamai, T., T. Yamanishi, H. Shirataki, K. Takagi, H. Asami, Y. Ito and K. Yoshida (2004). "Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer." Clin Cancer Res **10**(14): 4799-4805.
- Kasahara, M., Y. Takahashi, T. Nagata, S. Asai, T. Eguchi, Y. Ishii, M. Fujii and K. Ishikawa (2000). "Thymidylate synthase expression correlates closely with E2F1 expression in colon cancer." Clin Cancer Res **6**(7): 2707-2711.
- Kawasaki, Y., M. Sagara, Y. Shibata, M. Shirouzu, S. Yokoyama and T. Akiyama (2007). "Identification and characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42." Oncogene **26**(55): 7620-7267.
- Kawasaki, Y., S. Tsuji, K. Muroya, S. Furukawa, Y. Shibata, M. Okuno, S. Ohwada and T. Akiyama (2009). "The adenomatous polyposis coli-associated exchange factors Asef and Asef2 are required for adenoma formation in Apc(Min/+)mice." EMBO Rep **10**(12): 1355-1362.
- Kearney, C. J., C. Sheridan, S. P. Cullen, G. A. Tynan, S. E. Logue, I. S. Afonina, D. Vucic, E. C. Lavelle and S. J. Martin (2013). "Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonists regulate spontaneous and tumor necrosis factor (TNF)-induced proinflammatory cytokine and chemokine production." J Biol Chem **288**(7): 4878-4890.
- Keats, J. J., R. Fonseca, M. Chesi, R. Schop, A. Baker, W. J. Chng, S. Van Wier, R. Tiedemann, C. X. Shi, M. Sebag, E. Braggio, T. Henry, Y. X. Zhu, H. Fogle, T. Price-Troska, G. Ahmann, C. Mancini, L. A. Brents, S. Kumar, P. Greipp, A. Dispenzieri, B. Bryant, G. Mulligan, L. Bruhn, M. Barrett, R. Valdez, J. Trent, A. K. Stewart, J. Carpten and P. L. Bergsagel (2007). "Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma." Cancer Cell **12**(2): 131-144.
- Kim, W. Y., S. Y. Lee, Y. J. Jung, H. B. Chae, G. M. Nawkar, M. R. Shin, S. Y. Kim, J. H. Park, C. H. Kang, Y. H. Chi, I. P. Ahn, D. J. Yun, K. O. Lee, Y. M. Kim, M. G. Kim and S. Y. Lee (2011). "Inhibitor of apoptosis (IAP)-like protein lacks a baculovirus IAP repeat (BIR) domain and attenuates cell death in plant and animal systems." J Biol Chem **286**(49): 42670-42678.
- Koide, N., T. Yamada, R. Shibata, T. Mori, M. Fukuma, K. Yamazaki, K. Aiura, M. Shimazu, S. Hirohashi, Y. Nimura and M. Sakamoto (2006). "Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **12**(8): 2419-2426.
- Koleske, A. J. (2003). "Do filopodia enable the growth cone to find its way?" Sci STKE **2003**(183): pe20.
- Kortlever, R. M., P. J. Higgins and R. Bernards (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence." Nat Cell Biol **8**(8): 877-884.
- Kovesdi, I., R. Reichel and J. R. Nevins (1986). "Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation." Cell **45**(2): 219-228.
- Krek, W., M. E. Ewen, S. Shirodkar, Z. Arany, W. G. Kaelin, Jr. and D. M. Livingston (1994). "Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase." Cell **78**(1): 161-172.

- Krieg, A., R. G. Correa, J. B. Garrison, G. Le Negrate, K. Welsh, Z. Huang, W. T. Knoefel and J. C. Reed (2009). "XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14524-14529.
- Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12072-12077.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredevelde, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell **133**(6): 1019-1031.
- Kwon, M. J., E. S. Nam, S. J. Cho, H. R. Park, H. S. Shin, J. H. Park, C. H. Park and W. J. Lee (2010). "E2F1 expression predicts outcome in Korean women who undergo surgery for breast carcinoma." Ann Surg Oncol **17**(2): 564-571.
- La Thangue, N. B. and P. W. Rigby (1987). "An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells." Cell **49**(4): 507-513.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." Aging Cell **5**(2): 187-195.
- Lee, J., C. K. Park, J. O. Park, T. Lim, Y. S. Park, H. Y. Lim, I. Lee, T. S. Sohn, J. H. Noh, J. S. Heo, S. Kim, H. Lim do, K. M. Kim and W. K. Kang (2008). "Impact of E2F-1 expression on clinical outcome of gastric adenocarcinoma patients with adjuvant chemoradiation therapy." Clin Cancer Res **14**(1): 82-88.
- Lee, J. S., S. H. Leem, S. Y. Lee, S. C. Kim, E. S. Park, S. B. Kim, S. K. Kim, Y. J. Kim, W. J. Kim and I. S. Chu (2010). "Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors." J Clin Oncol **28**(16): 2660-2667.
- Lewis, S. M. and M. Holcik (2005). "IRES in distress: translational regulation of the inhibitor of apoptosis proteins XIAP and HIAP2 during cell stress." Cell Death Differ **12**(6): 547-553.
- Lin, R., S. Bagrodia, R. Cerione and D. Manor (1997). "A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation." Curr Biol **7**(10): 794-797.
- Lin, R., R. A. Cerione and D. Manor (1999). "Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation." J Biol Chem **274**(33): 23633-23641.
- Lin, W. C., F. T. Lin and J. R. Nevins (2001). "Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation." Genes Dev **15**(14): 1833-1844.
- Liston, P., W. G. Fong, N. L. Kelly, S. Toji, T. Miyazaki, D. Conte, K. Tamai, C. G. Craig, M. W. McBurney and R. G. Korneluk (2001). "Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity." Nat Cell Biol **3**(2): 128-133.
- Liu, J., D. Zhang, W. Luo, Y. Yu, J. Yu, J. Li, X. Zhang, B. Zhang, J. Chen, X. R. Wu, G. Rosas-Acosta and C. Huang (2011). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) mediates cancer cell motility via Rho GDP dissociation inhibitor (RhoGDI)-dependent regulation of the cytoskeleton." J Biol Chem **286**(18): 15630-15640.
- Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts and J. J. Zhao (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **8**(8): 627-644.
- Lopez, J., S. W. John, T. Tenev, G. J. Rautureau, M. G. Hinds, F. Francalanci, R. Wilson, M. Broemer, M. M. Santoro, C. L. Day and P. Meier (2011). "CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration." Mol Cell **42**(5): 569-583.
- Louie, M. C., J. X. Zou, A. Rabinovich and H. W. Chen (2004). "ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance." Mol Cell Biol **24**(12): 5157-5171.



- Lui, V. W., M. L. Hedberg, H. Li, B. S. Vangara, K. Pendleton, Y. Zeng, Y. Lu, Q. Zhang, Y. Du, B. R. Gilbert, M. Freilino, S. Sauerwein, N. D. Peyser, D. Xiao, B. Diergaarde, L. Wang, S. Chiosea, R. Seethala, J. T. Johnson, S. Kim, U. Duvvuri, R. L. Ferris, M. Romkes, T. Nukui, P. Kwok-Shing Ng, L. A. Garraway, P. S. Hammerman, G. B. Mills and J. R. Grandis (2013). "Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers." Cancer Discov **3**(7): 761-769.
- Ma, O., W. W. Cai, L. Zender, T. Dayaram, J. Shen, A. J. Herron, S. W. Lowe, T. K. Man, C. C. Lau and L. A. Donehower (2009). "MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression." Cancer Res **69**(6): 2559-2567.
- Mace, P. D., K. Linke, R. Feltham, F. R. Schumacher, C. A. Smith, D. L. Vaux, J. Silke and C. L. Day (2008). "Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment." J Biol Chem **283**(46): 31633-31640.
- Mace, P. D. and S. J. Riedl (2010). "Molecular cell death platforms and assemblies." Curr Opin Cell Biol **22**(6): 828-836.
- Makrodouli, E., E. Oikonomou, M. Koc, L. Andera, T. Sasazuki, S. Shirasawa and A. Pintzas (2011). "BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study." Mol Cancer **10**: 118.
- Malladi, S., M. Challa-Malladi, H. O. Fearnhead and S. B. Bratton (2009). "The Apaf-1\*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer." EMBO J **28**(13): 1916-1925.
- Mallette, F. A., M. F. Gaumont-Leclerc and G. Ferbeyre (2007). "The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence." Genes Dev **21**(1): 43-48.
- Mao, A. P., S. Li, B. Zhong, Y. Li, J. Yan, Q. Li, C. Teng and H. B. Shu (2010). "Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon-beta (IFN-beta) and cellular antiviral response." J Biol Chem **285**(13): 9470-9476.
- Mathew, S. J., D. Haubert, M. Kronke and M. Leptin (2009). "Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway." J Cell Sci **122**(Pt 12): 1939-1946.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." Oncogene **26**(22): 3113-3121.
- Mehrotra, S., L. R. Languino, C. M. Raskett, A. M. Mercurio, T. Dohi and D. C. Altieri (2010). "IAP regulation of metastasis." Cancer Cell **17**(1): 53-64.
- Merdzhanova, G., V. Edmond, S. De Seranno, A. Van den Broeck, L. Corcos, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin (2008). "E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35." Cell Death Differ **15**(12): 1815-1823.
- Michaelson, D., J. Silletti, G. Murphy, P. D'Eustachio, M. Rush and M. R. Philips (2001). "Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding." J Cell Biol **152**(1): 111-126.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand and M. G. Grutter (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." J Biol Chem **277**(47): 45162-45171.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.
- Mochizuki, N., S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki and M. Matsuda (2001). "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1." Nature **411**(6841): 1065-1068.

- Moller, M. B., P. W. Kania, Y. Ino, A. M. Gerdes, O. Nielsen, D. N. Louis, K. Skjodt and N. T. Pedersen (2000). "Frequent disruption of the RB1 pathway in diffuse large B cell lymphoma: prognostic significance of E2F-1 and p16INK4A." Leukemia **14**(5): 898-904.
- Moulin, M., H. Anderton, A. K. Voss, T. Thomas, W. W. Wong, A. Bankovacki, R. Feltham, D. Chau, W. D. Cook, J. Silke and D. L. Vaux (2012). "IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development." EMBO J **31**(7): 1679-1691.
- Muller, P. A., P. T. Caswell, B. Doyle, M. P. Iwanicki, E. H. Tan, S. Karim, N. Lukashchuk, D. A. Gillespie, R. L. Ludwig, P. Gosselin, A. Cromer, J. S. Brugge, O. J. Sansom, J. C. Norman and K. H. Vousden (2009). "Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling." Cell **139**(7): 1327-1341.
- Nahle, Z., J. Polakoff, R. V. Davuluri, M. E. McCurrach, M. D. Jacobson, M. Narita, M. Q. Zhang, Y. Lazebnik, D. Bar-Sagi and S. W. Lowe (2002). "Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F." Nat Cell Biol **4**(11): 859-864.
- Nakagawa, Y., M. Hasegawa, M. Kurata, K. Yamamoto, S. Abe, M. Inoue, T. Takemura, K. Hirokawa, K. Suzuki and M. Kitagawa (2005). "Expression of IAP-family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL)." Am J Hematol **78**(3): 173-180.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.
- Nelson, M. A., S. H. Reynolds, U. N. Rao, A. C. Goulet, Y. Feng, A. Beas, B. Honchak, J. Averill, D. T. Lowry, J. R. Senft, A. M. Jefferson, R. C. Johnson and L. M. Sargent (2006). "Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma." Cancer Biol Ther **5**(4): 407-412.
- Nevins, J. R. (1992). "E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins." Science **258**(5081): 424-429.
- Newbold, R. F. and R. W. Overell (1983). "Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene." Nature **304**(5927): 648-651.
- Noren, N. K., B. P. Liu, K. Burrige and B. Kreft (2000). "p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases." J Cell Biol **150**(3): 567-580.
- Oberoi, T. K., T. Dogan, J. C. Hocking, R. P. Scholz, J. Mooz, C. L. Anderson, C. Karreman, D. Meyer Zu Heringdorf, G. Schmidt, M. Ruonala, K. Namikawa, G. S. Harms, A. Carpy, B. Macek, R. W. Koster and K. Rajalingam (2011). "IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation." EMBO J.
- Oberoi, T. K., T. Dogan, J. C. Hocking, R. P. Scholz, J. Mooz, C. L. Anderson, C. Karreman, D. Meyer zu Heringdorf, G. Schmidt, M. Ruonala, K. Namikawa, G. S. Harms, A. Carpy, B. Macek, R. W. Koster and K. Rajalingam (2012). "IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation." EMBO J **31**(1): 14-28.
- Olson, M. F., A. Ashworth and A. Hall (1995). "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." Science **269**(5228): 1270-1272.
- Osmani, N., F. Peglion, P. Chavrier and S. Etienne-Manneville (2010). "Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic." J Cell Biol **191**(7): 1261-1269.
- Osmani, N., N. Vitale, J. P. Borg and S. Etienne-Manneville (2006). "Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration." Curr Biol **16**(24): 2395-2405.
- Park, S. M., J. B. Yoon and T. H. Lee (2004). "Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro." FEBS Lett **566**(1-3): 151-156.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2005). "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2." Curr Biol **15**(2): 129-133.

- Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo and J. C. Lacal (1997). "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins." Genes Dev **11**(4): 463-475.
- Petersen, S. L., L. Wang, A. Yalcin-Chin, L. Li, M. Peyton, J. Minna, P. Harran and X. Wang (2007). "Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis." Cancer Cell **12**(5): 445-456.
- Phillips, A. C., M. K. Ernst, S. Bates, N. R. Rice and K. H. Vousden (1999). "E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways." Mol Cell **4**(5): 771-781.
- Pichot, C. S., C. Arvanitis, S. M. Hartig, S. A. Jensen, J. Bechill, S. Marzouk, J. Yu, J. A. Frost and S. J. Corey (2010). "Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp." Cancer Res **70**(21): 8347-8356.
- Pillai, S., M. Kovacs and S. Chellappan (2010). "Regulation of vascular endothelial growth factor receptors by Rb and E2F1: role of acetylation." Cancer Res **70**(12): 4931-4940.
- Plenchette, S., S. Cathelin, C. Rebe, S. Launay, S. Ladoire, O. Sordet, T. Ponnelle, N. Debili, T. H. Phan, R. A. Padua, L. Dubrez-Daloz and E. Solary (2004). "Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event." Blood **104**(7): 2035-2043.
- Poincloux, R., F. Lizarraga and P. Chavrier (2009). "Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia." J Cell Sci **122**(Pt 17): 3015-3024.
- Polager, S. and D. Ginsberg (2008). "E2F - at the crossroads of life and death." Trends Cell Biol **18**(11): 528-535.
- Ponnelle, T., C. Chapusot, L. Martin, C. Bonithon-Kopp, A. M. Bouvier, S. Plenchette, D. Rageot, J. Faivre, E. Solary and F. Piard (2003). "Subcellular expression of c-IAP1 and c-IAP2 in colorectal cancers: relationships with clinicopathological features and prognosis." Pathol Res Pract **199**(11): 723-731.
- Potts, M. B., A. E. Vaughn, H. McDonough, C. Patterson and M. Deshmukh (2005). "Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP." J Cell Biol **171**(6): 925-930.
- Putzer, B. M. (2007). "E2F1 death pathways as targets for cancer therapy." J Cell Mol Med **11**(2): 239-251.
- Putzer, B. M. and D. Engelmann (2013). "E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back." Trends Mol Med **19**(2): 89-98.
- Qi, S., S. Mogi, H. Tsuda, Y. Tanaka, K. Kozaki, I. Imoto, J. Inazawa, S. Hasegawa and K. Omura (2008). "Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(11): 1047-1053.
- Qiu, R. G., A. Abo, F. McCormick and M. Symons (1997). "Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation." Mol Cell Biol **17**(6): 3449-3458.
- Rabbani, F., V. M. Richon, I. Orlow, M. L. Lu, M. Drobnjak, M. Dudas, E. Charytonowicz, G. Dalbagni and C. Cordon-Cardo (1999). "Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization." J Natl Cancer Inst **91**(10): 874-881.
- Rai, R., H. Dai, A. S. Multani, K. Li, K. Chin, J. Gray, J. P. Lahad, J. Liang, G. B. Mills, F. Meric-Bernstam and S. Y. Lin (2006). "BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer." Cancer Cell **10**(2): 145-157.
- Rajalingam, K., M. Sharma, N. Paland, R. Hurwitz, O. Thieck, M. Oswald, N. Machuy and T. Rudel (2006). "IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of C. trachomatis-infected cells." PLoS Pathog **2**(10): e114.

- Reardon, D. A., E. Michalkiewicz, J. M. Boyett, J. E. Sublett, R. E. Entrekin, S. T. Ragsdale, M. B. Valentine, F. G. Behm, H. Li, R. L. Heideman, L. E. Kun, D. N. Shapiro and A. T. Look (1997). "Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization." Cancer Res **57**(18): 4042-4047.
- Revenko, A. S., E. V. Kalashnikova, A. T. Gemo, J. X. Zou and H. W. Chen (2010). "Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark." Mol Cell Biol **30**(22): 5260-5272.
- Reymond, N., J. H. Im, R. Garg, F. M. Vega, B. Borda d'Agua, P. Riou, S. Cox, F. Valderrama, R. J. Muschel and A. J. Ridley (2012). "Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through beta1 integrin." J Cell Biol **199**(4): 653-668.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-399.
- Riedl, S. J., P. Fuentes-Prior, M. Renatus, N. Kairies, S. Krapp, R. Huber, G. S. Salvesen and W. Bode (2001). "Structural basis for the activation of human procaspase-7." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14790-14795.
- Rosano, L., R. Cianfrocca, S. Masi, F. Spinella, V. Di Castro, A. Biroccio, E. Salvati, M. R. Nicotra, P. G. Natali and A. Bagnato (2009). "Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2806-2811.
- Rossi, D., S. Deaglio, D. Dominguez-Sola, S. Rasi, T. Vaisitti, C. Agostinelli, V. Spina, A. Brusca, S. Monti, M. Cerri, S. Cresta, M. Fangazio, L. Arcaini, M. Lucioni, R. Marasca, C. Thieblemont, D. Capello, F. Facchetti, I. Kwee, S. A. Pileri, R. Foa, F. Bertoni, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci and G. Gaidano (2011). "Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma." Blood **118**(18): 4930-4934.
- Rossman, K. L., C. J. Der and J. Sondek (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-180.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres and D. V. Goeddel (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." Cell **83**(7): 1243-1252.
- Rumble, J. M., M. J. Bertrand, R. A. Csomos, C. W. Wright, L. Albert, T. W. Mak, P. A. Barker and C. S. Duckett (2008). "Apoptotic sensitivity of murine IAP-deficient cells." Biochem J **415**(1): 21-25.
- Sahai, E. (2005). "Mechanisms of cancer cell invasion." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 87-96.
- Saikumar, P., M. Mikhailova and S. L. Pandeswara (2007). "Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex." Front Biosci **12**: 3343-3354.
- Sakurai-Yageta, M., C. Recchi, G. Le Dez, J. B. Sibarita, L. Daviet, J. Camonis, C. D'Souza-Schorey and P. Chavrier (2008). "The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA." J Cell Biol **181**(6): 985-998.
- Salon, C., B. Eymin, O. Micheau, L. Chaperot, J. Plumas, C. Brambilla, E. Brambilla and S. Gazzeri (2006). "E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short)." Cell Death Differ **13**(2): 260-272.
- Samuel, T., K. Okada, M. Hyer, K. Welsh, J. M. Zapata and J. C. Reed (2005). "cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle." Cancer Res **65**(1): 210-218.
- Samuel, T., K. Welsh, T. Lober, S. H. Togo, J. M. Zapata and J. C. Reed (2006). "Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases." J Biol Chem **281**(2): 1080-1090.



- Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez and H. Steller (2008). "Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity." Genes Dev **22**(16): 2256-2266.
- Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Sharma, A., W. S. Yeow, A. Ertel, I. Coleman, N. Clegg, C. Thangavel, C. Morrissey, X. Zhang, C. E. Comstock, A. K. Witkiewicz, L. Gomella, E. S. Knudsen, P. S. Nelson and K. E. Knudsen (2010). "The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression." J Clin Invest **120**(12): 4478-4492.
- Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." Cancer Cell **2**(2): 103-112.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman and Y. Shi (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." Mol Cell **11**(2): 519-527.
- Shirley, S. and O. Micheau (2013). "Targeting c-FLIP in cancer." Cancer Lett **332**(2): 141-150.
- Silke, J., P. G. Ekert, C. L. Day, C. J. Hawkins, M. Baca, J. Chew, M. Pakusch, A. M. Verhagen and D. L. Vaux (2001). "Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP." EMBO J **20**(12): 3114-3123.
- Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang and D. L. Vaux (2005). "Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16182-16187.
- Silke, J., A. M. Verhagen, P. G. Ekert and D. L. Vaux (2000). "Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid?" Cell Death Differ **7**(12): 1275.
- Sinha, S. and W. Yang (2008). "Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42." Cell Signal **20**(11): 1927-1934.
- Snapper, S. B., F. Takeshima, I. Anton, C. H. Liu, S. M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R. C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M. B. Goldberg, F. S. Rosen, J. H. Hartwig and F. W. Alt (2001). "N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility." Nat Cell Biol **3**(10): 897-904.
- Snijders, A. M., B. L. Schmidt, J. Fridlyand, N. Dekker, D. Pinkel, R. C. Jordan and D. G. Albertson (2005). "Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma." Oncogene **24**(26): 4232-4242.
- Soengas, M. S., P. Capodieci, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J. G. Herman, W. L. Gerald, Y. A. Lazebnik, C. Cordon-Cardo and S. W. Lowe (2001). "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma." Nature **409**(6817): 207-211.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.
- Steeg, P. S. (2003). "Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells." Nat Rev Cancer **3**(1): 55-63.
- Stengel, K. and Y. Zheng (2011). "Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis." Cell Signal **23**(9): 1415-1423.
- Stengel, K. R. and Y. Zheng (2012). "Essential role of Cdc42 in Ras-induced transformation revealed by gene targeting." PLoS One **7**(6): e37317.
- Stevens, C., L. Smith and N. B. La Thangue (2003). "Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage." Nat Cell Biol **5**(5): 401-409.

- Suetsugu, S., K. Murayama, A. Sakamoto, K. Hanawa-Suetsugu, A. Seto, T. Oikawa, C. Mishima, M. Shirouzu, T. Takenawa and S. Yokoyama (2006). "The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation." J Biol Chem **281**(46): 35347-35358.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi and R. Takahashi (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8662-8667.
- Tanimoto, T., H. Tsuda, N. Imazeki, Y. Ohno, I. Imoto, J. Inazawa and O. Matsubara (2005). "Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas." Cancer Lett **224**(1): 141-151.
- Tcherkezian, J. and N. Lamarche-Vane (2007). "Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins." Biol Cell **99**(2): 67-86.
- Tchoghandjian, A., C. Jennewein, I. Eckhardt, K. Rajalingam and S. Fulda (2013). "Identification of non-canonical NF-kappaB signaling as a critical mediator of Smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells." Cell Death Dis **4**: e564.
- Tenev, T., K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain and P. Meier (2011). "The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs." Mol Cell **43**(3): 432-448.
- Tenev, T., A. Zachariou, R. Wilson, M. Ditzel and P. Meier (2005). "IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms." Nat Cell Biol **7**(1): 70-77.
- Tenev, T., A. Zachariou, R. Wilson, A. Paul and P. Meier (2002). "Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1." EMBO J **21**(19): 5118-5129.
- Tokunaga, F., T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano and K. Iwai (2011). "SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex." Nature **471**(7340): 633-636.
- Tokunaga, F., S. Sakata, Y. Saeki, Y. Satomi, T. Kirisako, K. Kamei, T. Nakagawa, M. Kato, S. Murata, S. Yamaoka, M. Yamamoto, S. Akira, T. Takao, K. Tanaka and K. Iwai (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." Nat Cell Biol **11**(2): 123-132.
- Torrino, S., O. Visvikis, A. Doye, L. Boyer, C. Stefani, P. Munro, J. Bertoglio, G. Gacon, A. Mettouchi and E. Lemichez (2011). "The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1." Dev Cell **21**(5): 959-965.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 11-20.
- Tseng, P. H., A. Matsuzawa, W. Zhang, T. Mino, D. A. Vignali and M. Karin (2010). "Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines." Nat Immunol **11**(1): 70-75.
- Tucci, M. G., G. Lucarini, D. Brancorsini, A. Zizzi, A. Pugnali, A. Giacchetti, G. Ricotti and G. Biagini (2007). "Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma." Br J Dermatol **157**(6): 1212-1216.
- Vallabhapurapu, S., A. Matsuzawa, W. Zhang, P. H. Tseng, J. J. Keats, H. Wang, D. A. Vignali, P. L. Bergsagel and M. Karin (2008). "Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling." Nat Immunol **9**(12): 1364-1370.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe and G. Kroemer (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.

- Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, P. Bogaert, B. Laukens, K. Zobel, K. Deshayes, D. Vucic, S. Fulda, P. Vandenabeele and M. J. Bertrand (2011). "cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production." Cell Death Differ **18**(4): 656-665.
- Vanni, C., C. Ottaviano, F. Guo, M. Puppo, L. Varesio, Y. Zheng and A. Eva (2005). "Constitutively active Cdc42 mutant confers growth disadvantage in cell transformation." Cell Cycle **4**(11): 1675-1682.
- Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit and D. Vucic (2007). "IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 669-681.
- Varfolomeev, E., T. Goncharov, A. V. Fedorova, J. N. Dynek, K. Zobel, K. Deshayes, W. J. Fairbrother and D. Vucic (2008). "c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **283**(36): 24295-24299.
- Varfolomeev, E., T. Goncharov, H. Maecker, K. Zobel, L. G. Komuves, K. Deshayes and D. Vucic (2012). "Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors." Sci Signal **5**(216): ra22.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- Vignjevic, D., S. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina and G. G. Borisy (2006). "Role of fascin in filopodial protrusion." J Cell Biol **174**(6): 863-875.
- Vince, J. E., D. Chau, B. Callus, W. W. Wong, C. J. Hawkins, P. Schneider, M. McKinlay, C. A. Benetatos, S. M. Condon, S. K. Chunduru, G. Yeoh, R. Brink, D. L. Vaux and J. Silke (2008). "TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha." J Cell Biol **182**(1): 171-184.
- Vince, J. E., W. W. Wong, I. Gentle, K. E. Lawlor, R. Allam, L. O'Reilly, K. Mason, O. Gross, S. Ma, G. Guarda, H. Anderton, R. Castillo, G. Hacker, J. Silke and J. Tschopp (2012). "Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation." Immunity **36**(2): 215-227.
- Vince, J. E., W. W. Wong, N. Khan, R. Feltham, D. Chau, A. U. Ahmed, C. A. Benetatos, S. K. Chunduru, S. M. Condon, M. McKinlay, R. Brink, M. Leverkus, V. Tergaonkar, P. Schneider, B. A. Callus, F. Koentgen, D. L. Vaux and J. Silke (2007). "IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 682-693.
- Vischioni, B., G. Giaccone, S. W. Span, F. A. Krzyt and J. A. Rodriguez (2004). "Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2." Exp Cell Res **298**(2): 535-548.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Vucic, D., W. J. Kaiser, A. J. Harvey and L. K. Miller (1997). "Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10183-10188.
- Wajapeyee, N., R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam and M. R. Green (2008). "Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7." Cell **132**(3): 363-374.
- Weaver, A. M. (2006). "Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion." Clin Exp Metastasis **23**(2): 97-105.
- Weber, R. G., C. Sommer, F. K. Albert, M. Kiessling and T. Cremer (1996). "Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization." Lab Invest **74**(1): 108-119.

- Wicki, A., F. Lehenbre, N. Wick, B. Hantusch, D. Kerjaschki and G. Christofori (2006). "Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton." Cancer Cell **9**(4): 261-272.
- Wilkinson, S., H. F. Paterson and C. J. Marshall (2005). "Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion." Nat Cell Biol **7**(3): 255-261.
- Wong, J. V., P. Dong, J. R. Nevins, B. Mathey-Prevot and L. You (2011). "Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry." Cell Cycle **10**(18): 3086-3094.
- Wright, K. M., M. W. Linhoff, P. R. Potts and M. Deshmukh (2004). "Decreased apoptosome activity with neuronal differentiation sets the threshold for strict IAP regulation of apoptosis." J Cell Biol **167**(2): 303-313.
- Wu, J. W., A. E. Cocina, J. Chai, B. A. Hay and Y. Shi (2001). "Structural analysis of a functional DIAP1 fragment bound to grim and hid peptides." Mol Cell **8**(1): 95-104.
- Wu, Z., S. T. Lee, Y. Qiao, Z. Li, P. L. Lee, Y. J. Lee, X. Jiang, J. Tan, M. Aau, C. Z. Lim and Q. Yu (2011). "Polycomb protein EZH2 regulates cancer cell fate decision in response to DNA damage." Cell Death Differ **18**(11): 1771-1779.
- Wurstle, M. L., M. A. Laussmann and M. Rehm (2012). "The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome." Exp Cell Res **318**(11): 1213-1220.
- Xu, G., D. M. Livingston and W. Krek (1995). "Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1357-1361.
- Xu, L., J. Zhu, X. Hu, H. Zhu, H. T. Kim, J. LaBaer, A. Goldberg and J. Yuan (2007). "c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1." Mol Cell **28**(5): 914-922.
- Yam, C. H., T. K. Fung and R. Y. Poon (2002). "Cyclin A in cell cycle control and cancer." Cell Mol Life Sci **59**(8): 1317-1326.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempik, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa and J. Condeelis (2005). "Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin." J Cell Biol **168**(3): 441-452.
- Yamasaki, L., R. Bronson, B. O. Williams, N. J. Dyson, E. Harlow and T. Jacks (1998). "Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice." Nat Genet **18**(4): 360-364.
- Yamazaki, K., T. Yajima, T. Nagao, H. Shinkawa, F. Kondo, K. Hanami, A. Asoh, I. Sugano and Y. Ishida (2003). "Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study." Pathol Res Pract **199**(1): 23-28.
- Yang, C., J. L. Davis, R. Zeng, P. Vora, X. Su, L. I. Collins, S. Vangveravong, R. H. Mach, D. Piwnica-Worms, K. N. Weilbaecher, R. Faccio and D. V. Novack (2013). "Antagonism of inhibitor of apoptosis proteins increases bone metastasis via unexpected osteoclast activation." Cancer Discov **3**(2): 212-223.
- Yang, H. W., M. G. Shin, S. Lee, J. R. Kim, W. S. Park, K. H. Cho, T. Meyer and W. D. Heo (2012). "Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases." Mol Cell **47**(2): 281-290.
- Yang, L., L. Wang and Y. Zheng (2006). "Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts." Mol Biol Cell **17**(11): 4675-4685.
- Yang, S. Z., F. T. Lin and W. C. Lin (2008). "MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis." EMBO Rep **9**(9): 907-915.
- Yang, Y., C. Yin, A. Pandey, D. Abbott, C. Sassetti and M. A. Kelliher (2007). "NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2." J Biol Chem **282**(50): 36223-36229.



- Yasuda, S., H. Taniguchi, F. Ocegüera-Yanez, Y. Ando, S. Watanabe, J. Monypenny and S. Narumiya (2006). "An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells." FEBS Lett **580**(14): 3375-3380.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2010). "Mechanisms of motility in metastasizing cells." Mol Cancer Res **8**(5): 629-642.
- Yuan, Z., L. Yao, M. Li, S. Liu, W. He and Y. Lu (2011). "Opposing roles for E2F1 in survival and death of cerebellar granule neurons." Neurosci Lett **499**(3): 164-169.
- Zacharatos, P., A. Kotsinas, K. Evangelou, P. Karakaidos, L. V. Vassiliou, N. Rezaei, A. Kyroudi, C. Kittas, E. Patsouris, A. G. Papavassiliou and V. G. Gorgoulis (2004). "Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas." J Pathol **203**(3): 744-753.
- Zarnegar, B. J., Y. Wang, D. J. Mahoney, P. W. Dempsey, H. H. Cheung, J. He, T. Shiba, X. Yang, W. C. Yeh, T. W. Mak, R. G. Korneluk and G. Cheng (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." Nat Immunol **9**(12): 1371-1378.
- Zender, L., M. S. Spector, W. Xue, P. Flemming, C. Cordon-Cardo, J. Silke, S. T. Fan, J. M. Luk, M. Wigler, G. J. Hannon, D. Mu, R. Lucito, S. Powers and S. W. Lowe (2006). "Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach." Cell **125**(7): 1253-1267.
- Zhang, Z., H. Wang, M. Li, E. R. Rayburn, S. Agrawal and R. Zhang (2005). "Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway." Oncogene **24**(48): 7238-7247.
- Zheng, Y., S. Bagrodia and R. A. Cerione (1994). "Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85." J Biol Chem **269**(29): 18727-18730.
- Zhou, H., M. Q. Du and V. M. Dixit (2005). "Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity." Cancer Cell **7**(5): 425-431.
- Zhu, J., D. Woods, M. McMahon and J. M. Bishop (1998). "Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf." Genes Dev **12**(19): 2997-3007.
- Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli and R. C. Armstrong (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." J Biol Chem **278**(10): 8091-8098.



## **Analyse des propriétés oncogéniques de cIAP1 : Contribution de ses partenaires cdc42 et E2F1**

La protéine cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1*) de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) est un oncogène avec une activité E3 ubiquitine ligase. Au cours de la différenciation de nombreux modèles cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales du colon, cellules souches hématopoïétiques, cardiomyocytes), cIAP1 sort du noyau pour se relocaliser dans le cytoplasme, cette relocalisation étant associée à un arrêt de prolifération. La plupart des fonctions connues de cIAP1 sont liées à sa localisation cytoplasmique où il est un régulateur important des voies de signalisation des récepteurs du TNF- $\alpha$  et de NF- $\kappa$ B. Cependant, cIAP1 est principalement exprimée dans le noyau de différents types cellulaires ce qui n'est pas en accord avec son rôle dans la signalisation cellulaire. Mon travail de thèse a permis d'identifier un rôle de cIAP1 dans la prolifération cellulaire. cIAP1 interagit avec le facteur de transcription E2F1 et favorise son recrutement sur les promoteurs des Cycline E et A impliquées dans les transitions G1/S et G2 du cycle cellulaire, ce qui augmente l'expression des transcrits et des protéines de ces deux cibles. Il semblerait que par cette activité, cIAP1 régule la prolifération des cellules et soit important dans l'équilibre entre la prolifération et la différenciation, deux mécanismes cellulaires étroitement liés. Dans un second travail, nous avons montré que cIAP1 est déterminant dans le remodelage du cytosquelette d'actine en réponse au TNF- $\alpha$ . Dans les fibroblastes, le TNF- $\alpha$  induit la formation de fines protrusions membranaires riches en actine appelées filipodes, cette formation étant régulée par cdc42. Mes travaux ont montrés que cIAP1, associé à son partenaire historique TRAF2, régule la formation de ces filipodes. Il est capable d'interagir directement avec la RhoGTPase Cdc42 et de contrôler son activation après un traitement par le TNF- $\alpha$ , mais aussi par l'EGF. De plus, cIAP1 régule également la transformation oncogénique par HRas en augmentant les propriétés invasives et migratoires des cellules. Ces nouvelles fonctions de cIAP1 pourraient contribuer à ses propriétés oncogéniques.

**Mots clés :** cIAP1, E2F1, cdc42, prolifération, TNF- $\alpha$ , cytosquelette d'actine, Rho GTPases, filipodes, HRas, transformation oncogénique.

### **cIAP1 oncogenic properties analysis : contribution of its partners cdc42 and E2F1.**

The inhibitor of apoptosis protein cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein-1*) from the IAP family (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) is an oncogene with an E3 ubiquitin ligase activity. cIAP1 is relocalized from the nucleus to the cytoplasm during the differentiation of many kind of cellular models (macrophages, dendritic cells, colon epithelial cells, hematopoietic stem cells, cardiomyocytes) and this relocalization is associated with a proliferation arrest. The well-known functions of cIAP1 are associated with its cytoplasmic localization, where it regulates the TNF $\alpha$  receptors and NF- $\kappa$ B signaling pathways. However, cIAP1 is mainly expressed in the nucleus on many cell types which is not in accordance with its cell signalling activity. My work identifies a function of cIAP1 in proliferation regulation. cIAP1 interacts with E2F1 transcription factor and favors its recruitment on Cyclins E and A promoters, both involved in G1/S and G2 phases of the cell cycle, which leads to high level of transcript and protein expression of these two targets. It seems that cIAP1 regulates the cellular proliferation and is important for the balance between proliferation and differentiation, two mechanisms tightly connected in cells. In a second work, we showed that cIAP1 is critical for actin cytoskeleton modification upon TNF- $\alpha$  treatment. In fibroblasts, TNF- $\alpha$  induce filipodia formation, a process regulated by cdc42. Our work showed that cIAP1, when associated with its partner TRAF2, interact and control cdc42 activation, a member of Rho GTPases protein family. We also observed that cIAP1 regulates HRas driven oncogenic transformation and increases the motility and invasiveness of the cells. These new functions of cIAP1 in the control of transcription factor and cell cytoskeleton could be important for its oncogenic properties.

**Keywords:** cIAP1, E2F1, cdc42, proliferation, TNF- $\alpha$ , actin cytoskeleton, Rho GTPases, filipodia, HRas, oncogenic transformation.